

Aus dem Institut für Anatomie und Zellbiologie
der Philipps-Universität Marburg
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. Weihe
Arbeitsgruppe Reproduktionsbiologie: Prof. Dr. Aumüller
Arbeitsgruppe Zellbiologie: Prof. Dr. Seitz

Immunologische Pathomechanismen der experimentellen Autoimmun-Orchitis

INAUGURAL DISSERTATION
Zur Erlangung des Doktorgrades der Humanbiologie
(Dr.rer.physiol.)

dem Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt

von
Simone Gränz
aus Gießen

Marburg/Lahn 2005

Angenommen vom Fachbereich Medizin
der Philipps-Universität Marburg am 8.07.2005

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. Maisch

Referent: Prof. Dr. rer. physiol. Meinhardt

Coreferent: Prof. Dr. med. Renz

Pars pro toto.

1 Einleitung	9
1.1Der Hoden: Spermatogenese und Steroidogenese	9
1.2Das Immunsystem: Komponenten und Aufgaben im Hoden	13
1.3Der Hoden als immunprivilegiertes Organ	15
1.4Die drei großen Systeme: Neuro-, Immun- und Hormonsystem interagieren im Hoden	16
1.5Störungen der großen Systeme können zu immunologischer Infertilität führen	16
1.6 EAO als Modell einer Autoimmunkrankheit des Hodens	17
1.7Das Tiermodell	19
1.8Die Ziele dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:	21
 2 Material und Methoden	 22
2.1Material	22
2.1.1Geräte und Zubehör	22
2.1.2Elektronische Dokumentation und Datenverarbeitung, sowie statistische Analysen	23
2.1.2.1Programme	23
2.1.2.2Häufig verwendete Internetadressen	24
2.1.3Reagenzien und Verbrauchsmaterial	24
2.1.4Enzyme, Fertigpuffer, Antibiotika, Kits und Marker	24
2.1.4.1Enzyme und Fertigpuffer:	24
2.1.4.2Antibiotika	24
2.1.4.3Kits:	24
2.1.4.4Marker:	24
2.1.5Häufig verwendete Puffer und Lösugen	25
2.1.5.1 Puffer für Western Blot:	25
2.1.5.2Puffer für mikrobiologische Arbeiten:	25
2.1.5.3Puffer für die DNA-Präparation mittels alkalischer Lyse:	26
2.1.5.4Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit RNA:	26
2.1.6Versuchsbegleitende Injektionslösungen	27
2.1.6.1Narkosemittel	27
2.1.6.2Adjuvansien	27
2.1.7Bakterienstämme, Vektoren und Inserts	27
2.1.7.1Bakterienstämme	27
2.1.7.2Vektoren und Inserts	27
2.1.8Versuchstiere	28
2.2Methoden	29
2.2.1Tiermodell	29
2.2.1.1Gewichtskontrollen der Ratten	29
2.2.1.2Herstellung von Hodenhomogenat und Trockengewichtsbestimmung	29
2.2.1.3Herstellung der Immunisierungslösungen	29
2.2.1.4 Immunisierung	30
2.2.1.5Traumatisierung	31
2.2.1.6Versuchsende und Organentnahme	31

2.2.1.7 Gewinnung von Normalserum	31
2.2.2 Morphologische Methoden	32
2.2.2.1 Kryokonservierung	32
2.2.2.2 Herstellung von Kryostatschnitten	32
2.2.2.3 Fixation von Geweben zur Paraffineinbettung	32
2.2.2.4 Paraffineinbettung und Herstellung von Paraffinschnitten	33
2.2.2.5 Objektträgerbeschichtungen	34
2.2.2.6 Gewinnung von Nebenhodenspermien und Herstellung von Spermienausstrichen	34
2.2.2.7 Färbungen	34
2.2.2.8 Immunhistochemische Nachweise	35
2.2.3 Quantifizierung der Immunzellpopulationen im Hoden	39
2.2.4 cDNA-Atlas-Array-Methode	39
2.2.4.1 RNA-Aufbereitung aus Hodengewebe für den Atlas Array	39
2.2.4.2 Spektrometrische Quantifizierung von Nucleinsäuren	40
2.2.4.3 DNase I Behandlung der Total RNA	40
2.2.4.4 Herstellung und Aufreinigung der radioaktiv markierten cDNA-Sonden	41
2.2.4.5 Hybridisierung	43
2.2.4.6 Detektion und densitometrische Auswertung	44
2.2.5 Western-Blot-Analyse	44
2.2.5.1 Herstellung von Hodenhomogenat	44
2.2.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford	44
2.2.5.3 1-Dimensionale-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	44
2.2.5.4 2-Dimensionale-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	45
2.2.5.5 Fixierung, Färbung und Entfärbung der Gele	47
2.2.5.6 Westernblot-Analyse	48
2.2.5.7 Visualisierung der Blotreaktionen	50
2.2.6 Methoden in der Zellkultur	51
2.2.6.1 Permanente Kultivierung der R2-Makrophagen	51
2.2.6.2 Subkultivierung der Kulturzellen	51
2.2.6.3 Bestimmung der Zellzahlen	51
2.2.6.4 Stimulation der Zellen mit LPS	51
2.2.6.5 RNA-Extraktion der stimulierten Zellen	52
2.2.6.6 Einfrieren der Zellen	52
2.2.7 Sondenherstellung für den Northern-Blot	52
2.2.7.1 Chemische Transfektion	52
2.2.7.2 Aufbewahrung der transformierten Bakterien	53
2.2.7.3 Präparation der Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse	53
2.2.8 Northern-Blot-Analyse	53
2.2.8.1 Restriktionsspaltung zur Linearisierung der Plasmide	53
2.2.8.2 RNA-Sondenherstellung	54
2.2.8.3 Bestimmung der Markierungseffizienz mittels Dotblot	54
2.2.8.4 Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA	55
2.2.8.5 Transfer der RNA auf Nitrocellulosemembranen mittels Vakuum-Blot	56
2.2.8.6 Hybridisierung der RNA-Blots mit markierten cRNA-Sonden	56
2.2.9 RT-PCR	57
2.2.9.1 RNA-Präparation und Probenvorbereitung	57
2.2.9.2 Herstellung der cDNA mittels reverser Transkription (RT-PCR)	57
2.2.9.3 Primer-Optimierung	58

2.2.9.4	Verwendete Primer	59
2.2.9.5	Amplifizierung der differenziell exprimierten Gene (CD5, IL-1R1, IL-7 precursor und IL-8R beta) mittels PCR	59
2.2.9.6	Auftrennung der amplifizierten Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese	60
2.2.9.7	Densitometrische und statistische Auswertung	61
2.2.10	In-Situ-Hybridisierung (ISH)	61
2.2.10.1	Methode	61
2.2.10.2	Sonden und Gewebeschnitte	61
2.2.10.3	Verwendete Lösungen für die in-situ-Hybridisierung:	61

3 Ergebnisse 65

3.1 Einflüsse der Versuchsmanipulationen auf die Gesamtkonstitution, die Milz, den Thymus und den Hoden der Ratte 65

3.1.1	Makroskopische Beurteilung und Gesamteindruck der Tiere während des Versuchs	65
3.1.2	Auswirkungen der EAO auf das Körpergewicht der Ratte	66
3.1.3	Auswirkungen der EAO auf die Milz- und Thymusgewichte	67
3.1.4	Serumparameter und EAO	68

3.2 Auswirkungen der EAO auf den Rattenhoden 70

3.3 Morphologische Ergebnisse 71

3.3.1	Optimierung der Gewebefixation	71
3.3.2	Evaluation und Definition der EAO-Responder mittels HE-Färbung und Durchlichtmikroskopie	72
3.3.3	Induktionseffizienzen der verschiedenen Immunisierungsprotokolle	75
3.3.4	Delayed Type Hypersensitivity (DTH) und EAO	79

3.4 Morphologische Charakterisierung der EAO 80

3.4.1	Tubuluswandverdickungen bei der EAO	80
3.4.2	Mastzellen in der EAO	80
3.4.3	Spermienmorphologie und EAO	81
3.4.4	Immunhistochemische Nachweise	82
3.4.4.1	Immunhistochemischer Nachweis mittels Antigenfreilegungspuffer und Mikrowellenbehandlung	82
3.4.4.2	Immunfluoreszenzen	83
3.4.4.3	Immunhistochemischer Nachweis von Immunzellpopulationen an kryokonserviertem Gewebe mit Hilfe der ABC-Methode	84
3.4.5	Zusammenhang der Autoantikörperentwicklung der Rattenstämme Wistar/Kyoto und Lewis bezüglich der Pathogenese der EAO	100
3.4.6	Identifikation der Auto-Antigene	104
3.4.7	Cytokinexpression in der EAO	106
3.4.8	In-situ-Hybridisierung zum Nachweis der Cytokinexpression bei der Pathogenese der EAO	107
3.4.9	Differentielle Genexpression in der Pathogenese der EAO	113
3.4.9.1	Ermittlung der differentiell exprimierten Gene während der EAO mittels cDNA-Atlas-Array	113
3.4.9.2	Verifikation der differentiellen Genexpression	115

4 Diskussion 120

4.1 Marker der EAO 120

4.1.1 Die Gesamtkonstitution der Versuchstiere 120

4.1.2 Der Hoden während der Pathogenese der EAO 120

4.1.3 DTH und EAO-Entwicklung 121

4.2 Abhängigkeiten der Induktionseffizienzen 122

4.3 Immunzellen im Hoden 123

4.3.1 Makrophagen 123

4.3.2 T-Zellen 125

4.3.3 Dendritische Zellen (DCs) 128

4.3.4 Mastzellen (MZ) 129

4.3.5 MHC II, CD25 und Ki67 131

4.4 Pathophysiologie der Cytokine im Hoden 131

4.4.1 MCP-1 ein pro-inflammatorischer Faktor in der Pathogenese der EAO 132

4.4.2 TGF- β mehr als nur ein Klassenwechsel ? 132

4.4.3 TNF- α Initiator oder nur Verstärker ? 133

4.4.4 Das IL-1 System des Hodens 135

4.4.5 Interleukin-6 als TH2-Cytokin ? 136

4.4.6 IL-10 die humorale Protektion des Hodens ? 138

4.5 Neuro-Immun-Endokrine Interaktionen während der Pathogenese der EAO 139

4.6 Differenziell exprimierte Gene in der EAO 140

4.7 Die Rolle der Autoantikörper in der EAO 142

4.8 Autoantigene der EAO 143

5 Zusammenfassung 145

6 Literaturverzeichnis 147

7 Anhang 166

7.0.1 Abkürzungsverzeichnis 166

7.0.2 Lebenslauf 168

7.0.3 Liste der Akademischen Lehrer 169

7.0.4 Danksagung 169

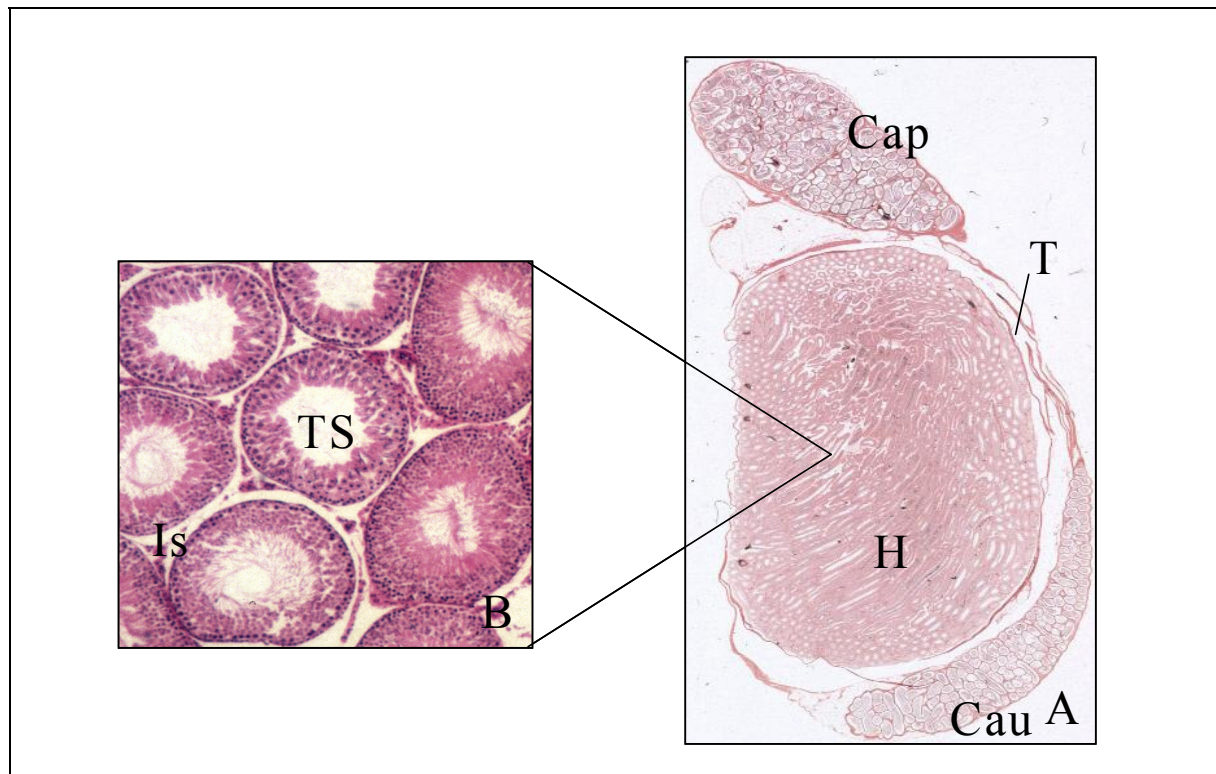
7.0.5 Ehrenwörtliche Erklärung 171

1 Einleitung

1.1 Der Hoden: Spermatogenese und Steroidogenese

Der menschliche Hoden ist ein paariges pflaumenförmiges Organ von etwa 4-5 cm Länge, etwa 3 cm Tiefe und 2,5 cm Dicke, sein Gewicht beläuft sich auf etwa 11-17 g, wobei der rechte Hoden gewöhnlich etwas dicker und schwerer ist und etwas weiter in den Hodensack hineinreicht. Im Hodensack (Scrotum), einer hochspezialisierten Hauttasche, kommt der Hoden außerhalb der Leibeshöhle zu liegen. Durch seine Lage und durch die Klimatisierung, die durch das Venensystem des Plexus pampiniformis gewährleistet wird, liegt die normale testikuläre Temperatur 2-3° niedriger als die Körpertemperatur. Das ist wesentlich für die Spermatogenese, eine der beiden Hauptaufgaben des Hodens. Ebenfalls wichtig für den Ablauf der Spermatogenese ist der Binnendruck des Hoden, der durch die Tunica albuginea, eine derbe Membran, die die Hoden umhüllt, aufrechterhalten wird.

Abbildung 1: Strukturen des Rattenhodens

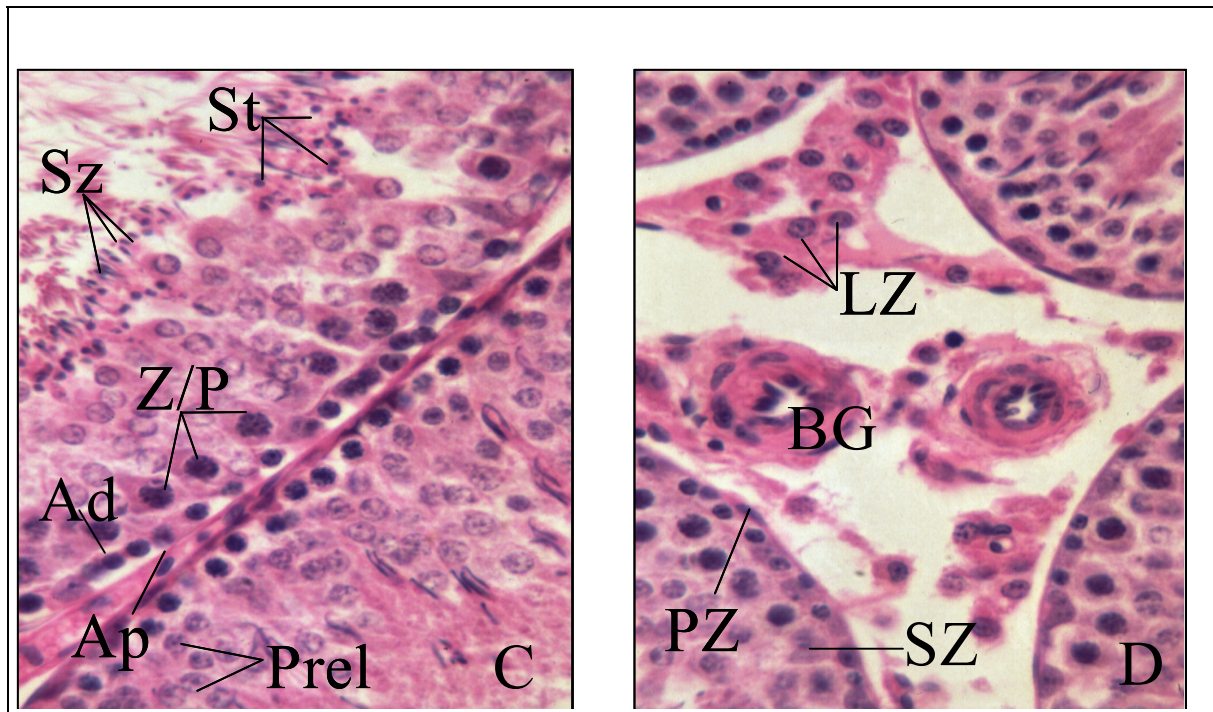


A: Histologische Übersicht eines Rattenhodens (H) mit Nebenhoden, der sich aus Caput (Cap), Corpus (hier nicht in der Schnittebene) und Cauda (Cau) zusammensetzt. Die Tunica albuginea ist teilweise abgelöst (T). B: Übersicht über einige Tubuli seminiferi (TS) mit dem dazwischenliegenden Interstitium (IS).

Die Kapsel verdickt sich an der Hodenrückseite, dem Mediastinum testis, und ragt in das Hodenparenchym hinein. Fibröse Anteile der Kapsel verlaufen als Septen aus dem Mediastinum in den Hoden und unterteilen diesen in etwa 250-350 Läppchen, die jeweils mit 1-4 Tubuli seminiferi gefüllt sind. Die Gesamtlänge der Samenkanälchen beläuft sich auf etwa 300-900 m, die unterteilt sind in Einzelstücke von etwa 80 cm Länge mit einem Durchmesser von etwa 150 µm. Beide Enden dieser Samenkanälchen sind wie eine Schaukel am Rete testis aufgehängt, so daß sich das samenbildende Kanälchen in das verzweigte System des Rete testis entleeren kann. Die Samenkanälchen setzen sich aus einem komplexen System von Vorläuferzellen der zukünftigen Spermien (Keimzellen) sowie Ernährungs- und Stützzellen (Sertoli Zellen) zusammen. Umgeben wird das Keimepithel von einer Basalmembran, die umhüllt wird von einer kollagenfaserigen Schicht mit Fibroblasten und andern Zellen mit spindelförmigem Erscheinungsbild. Diese Zellen sind kontraktile Myoidzellen, die wie glatte Muskelzellen intermediäre Filamente und Desmin enthalten. Manche Tiere zeigen eine kontinuierliche Schicht von Peritubulärzellen, die sich rhythmisch kontrahieren und so für den Transport der noch unbeweglichen Keimzellen in das ableitende System sorgen. Die Einheit aus Basalmembran, kollagenen Fasern und myoiden Peritubulärzellen wird auch Tunica propria genannt. Innerhalb dieser schlauchartigen Strukturen liegt das Keimepithel, welches für die Bildung der männlichen Keimzellen, der Spermien, verantwortlich ist. Die Bildung und Reifung dieser Zellen wird auch Spermatogenese genannt. Unterschiedliche Reifestadien der Keimzellen sind beim Menschen innerhalb eines Tubulus spiralförmig angeordnet. Dabei werden aus diploiden Zellen schließlich haploide Spermatozoen .

Die gesamte Spermatogenese läßt sich dabei in drei Hauptbestandteile unterteilen: Spermatogonienproliferation und -Reifung, Meiose und Spermiogenese. Bei der Spermatogonien-Reifung unterscheidet man nach den einzelnen Entwicklungsstadien Spermatogonien Typ A dark, als sich erneuernde Zellen im Keimepithel. Die nächste Stufe sind die Spermatogonien Typ A pale und als letzte Entwicklungsstufe die Spermatogonien vom Typ B, welche dann den zweiten Teil der Spermatogenese, die Meiose, mit ihren Zwischenstadien Präleptotän, Leptotän, Zygotän, frühes Pachytän, spätes Pachytän und Diplotän durchlaufen.

Abbildung 2: Keimepithel und Interstitium



C: Ein Teilausschnitt eines Samenkanälchens mit den einzelnen Reifestadien der Spermatogenese. (Ad) Spermatogonie Typ A dark, (Ap) Spermatogonie Typ A pale, primäre Spermatocyten im Präleptotän (Prel), im Zygotän/Pachytän (Z/P), Spermatiden (St) und Spermatozoen (Sz), sowie die u.a. zur Ernährung dienenden Sertoli Zellen deren Grenzen nur sehr schwer auszumachen sind. D: Ausschnitt aus dem Interstitium, mit Blutgefäßen (BG) und Leydigzellen (LZ). Gut zu erkennen ist eine Peritubulärzelle (PZ) und eine Sertoli Zelle (SZ).

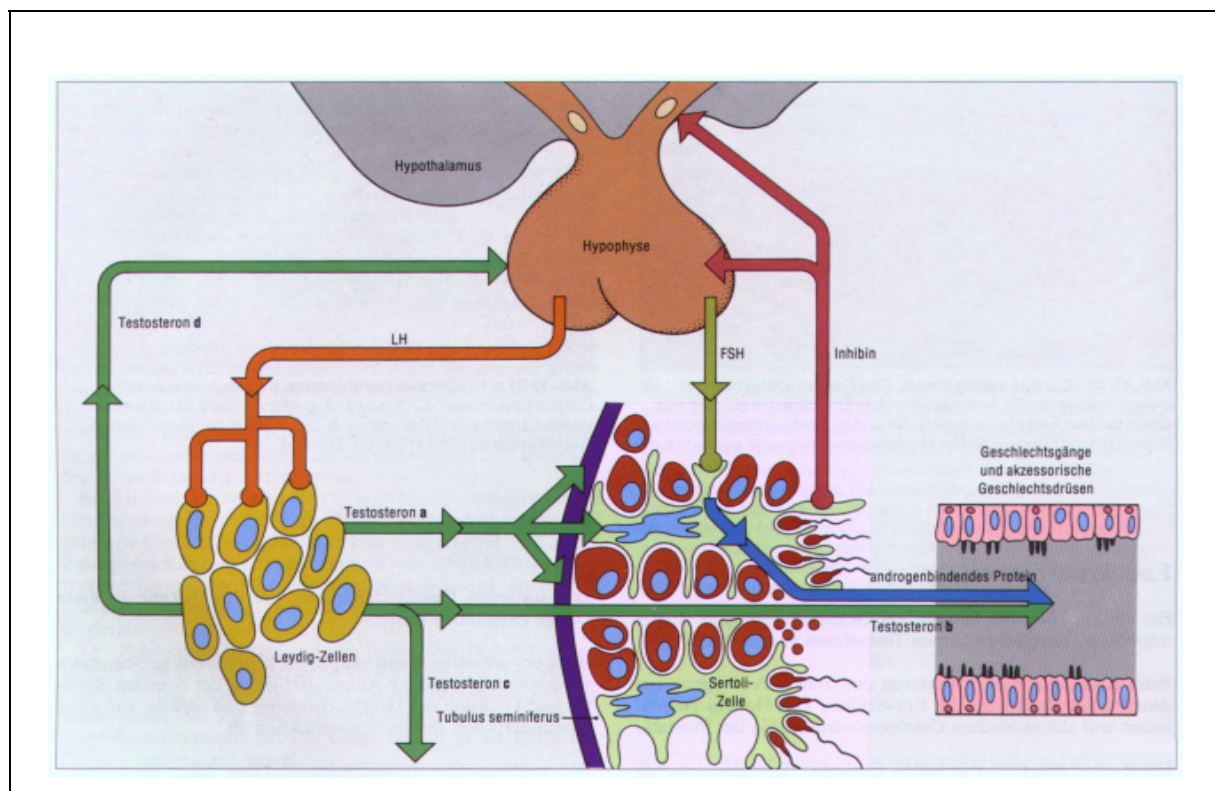
Diese Zwischenstadien werden als primäre und sekundäre Spermatozyten bezeichnet und bilden die Reifeteilungen. Die Spermiogenese beginnt mit den haploiden Spermatiden. Die Spermiogenese teilt sich in vier Phasen: Golgi-, Kappen-, Akrosomen- und Reifungsphase. Sie erzeugt aus haploiden Spermatozyten die Spermatozoen. Während der gesamten Spermatogenese halten die Keimzellen engen Kontakt mit den Sertoli-Zellen, welche Stütz- und Ernährungsfunktion für die Spermien ausüben und die Residualkörperchen phagozytieren.

Eine weitere Aufgabe der Sertoli-Zellen ist der Aufbau der Blut-Hoden-Schranke, die durch *tight junctions* zwischen benachbarten Sertoli-Zellen gebildet wird, und die Spermatogonien und Spermatocyten bis zum Präleptotän-Stadium in das basale Kompartiment segregiert. Das adluminal Kompartiment enthält die restlichen Zellen des Keimepithels. Diese adluminal liegenden Keimzellen werden jedoch nicht nur von den Sertoli Zellen ernährt, sondern auch vor körperfremden und körpereigenen Angriffen geschützt. Dazu gehören auch Immunglobuline, die unter physiologischen Umständen die Blut-Hoden-Schranke nicht passieren können.

Keimzellen im adluminalen Kompartiment sind potentielle Autoantigene, da sie erst während

der Pubertät exprimiert werden, nachdem die Unterscheidung von *selbst* und *nicht selbst* im Immunsystem längst abgeschlossen wurde. Im geschlechtsreifen Hoden produzieren Sertoli-Zellen das androgenbindende Protein (ABP), welches von den Leydig-Zellen sezerniertes Testosteron und Dihydroxytestosteron bindet und den Nebenhoden zuführt. Das von den Leydig-Zellen produzierte Testosteron wird über einen Feedback-Mechanismus der Hypophyse unter Beteiligung von luteinisierendem Hormon (LH) reguliert. Leydig-Zellen stehen beim Menschen also nicht nur in enger Beziehung zu Nervenfasern (siehe Abbildung 3:), sondern auch zu den Makrophagen (siehe auch 4.3 Makrophagen). Außerhalb der Blut-Hoden-Schranke gelangt das Testosteron durch die Blut- und Lymphgefäße des Hodens zu den entsprechenden Zielorganen, wobei besonders Bläschendrüse und Prostata androgenabhängig sind. Testosteron wirkt auf den gesamten Organismus des Mannes anabol und sorgt für die Ausbildung der sekundären Geschlechtsmerkmale.

Abbildung 3: Hormonelle Steuerung des männlichen Geschlechtsapparats (entnommen aus Stevens und Lowe, 1992)

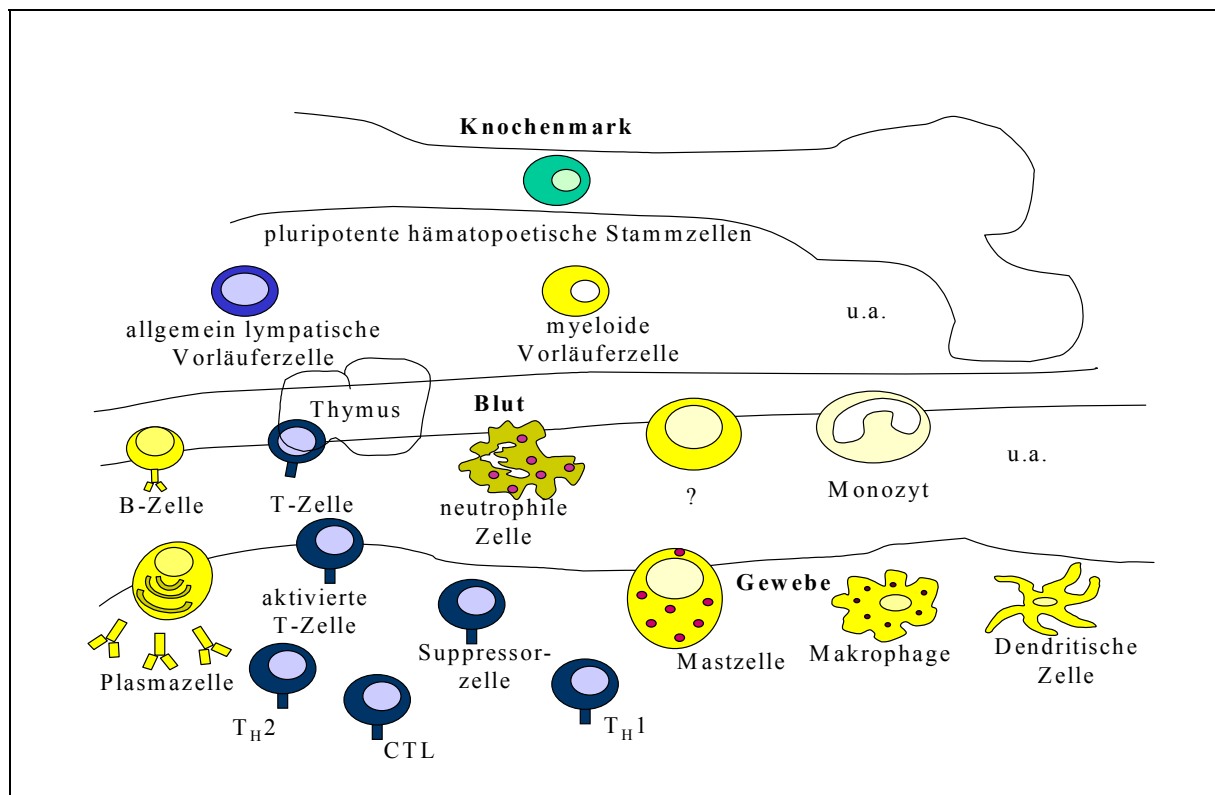


Das Testosteron stimuliert die Spermatogenese in den Tubuli seminiferi (a), sorgt für die Aufrechterhaltung von Struktur und Funktion der Geschlechtsgänge und akzessorischen Geschlechtsdrüsen (b), stimuliert die Ausprägung und Erhaltung der sekundären Geschlechtsmerkmale (c) und vermittelt den Feedback-Mechanismus (d) zur Kontrolle der Ausschüttung von luteinisierendem Hormon (LH) in der Hypophyse. Die Testosteronabgabe durch die Leydig-Zellen wird von LH stimuliert. Sertoli-Zellen sezernieren androgenbindendes Protein (ABP) unter dem Einfluß des follikelstimulierenden Hormons (FSH) aus der Hypophyse und produzieren auch Inhibin, das für die Feedbackkontrolle verantwortlich ist.

1.1 Das Immunsystem: Komponenten und Aufgaben im Hoden

Die Umwelt setzt den Menschen ständig Bakterien, Viren, Parasiten und schädlichen Substanzen aus. Zur spezifischen Abwehr entwickelte sich ein System, in dem hochspezialisierte Zellen über Botenstoffe (Cytokine) miteinander kommunizieren. Zellen, Cytokine und die Organe, in denen diese Zellen heranreifen und programmiert werden, nennt man Immunsystem. Es besteht im wesentlichen aus Lymphknoten, Milz, Thymus und Knochenmark.

Abbildung 4: Vereinfachte Teilübersicht über die Immunzellentwicklung



Gezeigt ist eine vereinfachte Übersicht über die Entwicklung der Immunzellen vom Knochenmark bis hin zu den Geweben in denen diese Zellen ihren Aufgaben nachgehen. Pluripotente Stammzellen im Knochenmark bringen allgemeine lymphatische und myeloide Vorläuferzellen hervor (VZ). Aus den lymphatischen VZ entwickeln sich die T-Lymphozyten, die ihre Reifung im Thymus absolvieren. Aus den gleichen VZ entwickeln sich auch die B-Zellen. Nach Stimulationen entwickeln sich aus B-Zellen Plasmazellen und aus T-Zellen aktivierte T-Zellen, mit je unterschiedlichen Subtypen, die sich durch Oberflächenmoleküle und ihre Kooperationspartner unterscheiden. Aus den myeloiden Vorläuferzellen entwickeln sich u.a. neutrophile Granulozyten und Monozyten, aus denen sich dann Mastzellen, Makrophagen und Dendritische Zellen des Gewebes differenzieren. Alle diese Entwicklungs- und Differenzierungsvorgänge werden durch unterschiedliche Cytokine beeinflusst und gesteuert (hier nicht gezeigt).

Eine Immunantwort auf ein Pathogen oder auch Antigen hängt von dem Zusammenspiel aller Komponenten des Systems ab. Sie beginnt damit, daß Antigene von bereits immunkompetenten

Zellen erkannt werden, die antigenpräsentierende Zellen (APC) genannt werden. Es handelt sich meist um Makrophagen oder Dendritische Zellen. Antigene werden von diesen APCs aufgenommen, prozessiert und auf speziellen Oberflächenmolekülen (MHC) den Lymphozyten präsentiert. Je nach Antigen, MHC-Typ und beteiligten Cytokinen können unterschiedliche Immunantworten hervorgerufen werden.

MHC I-Moleküle, die auch Autoantigene (z.B. Tumorantigene) exprimieren, führen zur Aktivierung einer CD8 T-Zellantwort, die zur Zerstörung der betroffenen Zellen führt. MHC II-Moleküle interagieren mit CD4 T-Zellen. Je nach Antigen und Cytokinmuster können hier unterschiedliche Helferzell-Subpopulationen entstehen, die entweder eine T-Zellantwort (Th1) oder eine B-Zellantwort (Th2) initiieren. Eine T-Zell-Antwort führt zu einer Rekrutierung und Proliferation von T-Zellen, die dieses Antigen spezifisch erkennen können. Diese Art der Immunantwort wird zelluläre Immunantwort genannt und durch pro-inflammatorische Cytokine reguliert. Eine B-Zellantwort dagegen wird durch anti-inflammatorische Cytokine unterstützt und führt zu einer Aktivierung Antigen-spezifischer B-Zellen, welche sich anschließend zu Plasmazellen differenzieren. Diese Plasmazellen sezernieren dann für dieses Antigen spezifische Antikörper, die an das Antigen binden. Diese Opsonierung ermöglicht es Makrophagen Antigene zu eliminieren, was zu einer T-Zell-Antwort führen kann.

Die meisten Antigene lösen nicht nur die Entwicklung von Gedächtniszellen aus, die dann bei einem erneuten Kontakt zu einer schnelleren Reaktion des Immunsystems führen, sondern auch von Suppressorzellen, die an fast allen Stellen der Immunantwort regulierend eingreifen.

Tabelle 1: Teilüberblick über an der Regulation der Immunantwort beteiligten Cytokine

	Cytokin	Produziert von	Wirkung systemisch
Pro-inflammatorisch	IL-1 α und β	Makrophagen, Epithelzellen, (tote Zellen)	Fieber, T-Zell-Aktivierung, Makrophagen-Aktivierung
	IL-2	T-Zellen	Proliferation der T-Zellen
	TNF α	Makrophagen, natürliche Killerzellen	lokale Entzündung Endothelaktivierung
	IFN- γ	T-Zellen, natürliche Killerzellen	Aktivierung der Makrophagen, erhöhte MHC-Expression
	IL-12	B-Zellen, Makrophagen	aktiviert natürliche Killerzellen, induziert die Differenzierung von CD4-T-Zellen zu T _H 1-ähnlichen Zellen
	MIF	T-Zellen, andere	hemmt die Migration der Makrophagen
	MCP-1	Makrophagen, andere	chemotaktisches Molekül für Monozyten
	IL-8	Makrophagen, andere	chemotaktisches Molekül für neutrophile Zellen und T-Zellen

Tabelle 1: Teilüberblick über an der Regulation der Immunantwort beteiligten Cytokine

regulatorisch	IL-6	T-Zellen und Makrophagen	Wachstum und Differenzierung von T- und B-Zellen, Immunantwort der akuten Phase
anti-inflammatorisch	TGF- β	Chondrozyten, Monozyten, T-Zellen, andere	hemmt das Zellwachstum, entzündungshemmend
	IL-10	T-Zellen, Makrophagen, (Eppstein Barr-Virus)	wirksamer Inhibitor für Makrophagenfunktionen
	IL-4	T-Zellen, Mastzellen	B-Zellaktivierung, IgE-Wechsel
	IL-13	T-Zellen	Wachstum und Differenzierung der B-Zellen, hemmt die Produktion inflammatorischer Zytokine durch Makrophagen

1.1 Der Hoden als immunprivilegiertes Organ

In sogenannten immunologisch privilegierten Körperregionen, zu denen auch der Hoden, das Gehirn und auch die vordere Augenkammer gehören, lösen transplantierte Gewebe keine oder eine nur sehr verzögerte Immunreaktion aus. Strukturen wie die Blut-Hirn- oder Blut-Hoden-Schranke unterstützten die These, daß die Antigene dieser Regionen abgeschirmt werden, um eine Immunreaktion zu verhindern. Diese Antigene können die immunprivilegierten Regionen verlassen und mit T-Zellen interagieren, ohne das es zu einer Gewebeerstörung führt. Stattdessen werden Toleranz und Reaktionsmuster induziert, die das privilegierte Gewebe schützen. Die Kommunikation zwischen diesen privilegierten Geweben und dem Körper ist spezialisiert, sie verfügen über unkonventionelle Lymphabflüsse, durch die die Antigene das Gewebe verlassen können, um Immunreaktionen auszulösen. Zusätzlich werden charakteristische humorale Faktoren in diesen Geweben gebildet, die das Immunsystem zur Anergie, Toleranz oder einer T_H2 -Antwort führen, die das Gewebe nicht schädigt, so wie es eine T_H1 -Antwort tun würde. Zu den möglichen Faktoren, die dabei eine Rolle spielen, wird TGF- β gezählt, im Hoden möglicherweise auch das IL-10.

Eine weitere Ursache für den immunprivilegierten Status des Hodens könnte die quantitative Dominanz der CD8 T-Zellen sein, möglicherweise mit einer suppressiven Subpopulation. Hingegen überwiegen in den nicht immun-privilegierten Regionen des Körpers die CD4 T-Zellen über die CD8 T-Zellen.

1.2 Die drei großen Systeme: Neuro-, Immun- und Hormonsystem interagieren im Hoden

Die enge Interaktion dieser Systeme wird deutlich durch neuronale Zellen und Fasern, die hormonell vermittelt während der Pubertät in den Hoden auswachsen. Die Interaktionen von catecholaminergen Zellen im Hoden mit der sympathischen Innervation (Mayerhofer et al. 1999), eine direkte nervale Verbindung zwischen den Hoden und den paraventriculären Nuclei des Hypothalamus (Selvage et al., 2003) und der supprimierende Einfluß einer testikuläre Denervierung auf die Spermatogenese (Chow et al., 2000) verdeutlicht die enge Vernetzung dieser Systeme.

Immunzellen zeigen ihre Vernetzung durch die Sekretion von Neuropeptiden (Lamprecht 2001), die Vermittlung der pro-inflammatorischen Wirkung über einen Substanz-P-Rezeptor auf Makrophagen (Marriott et al., 2001) und durch die Interaktion von Neuropeptiden mit Dendritischen Zellen (Dunzendorfer et al., 2001). Wie die basale Testosteronproduktion durch Cytokine beeinflusst wird, ist noch Gegenstand kontroverser Diskussionen (Hales D.B. 1996). IL-1 könnte durch seine biologisch relevanten Konzentrationen in der interstitiellen Flüssigkeit des Hodens die Spermiogenese und das Zusammenspiel der testikulären Zellen modulieren (Huleihel et al., 2002). Obwohl eine essentielle Rolle von IL-1 bei der Steroidogenese und Spermatogenese nicht wahrscheinlich ist, da Mäuse ohne einen funktionierenden IL-1-Rezeptor normale sexuelle Funktionen aufweisen und fertil sind (Cohen P.E. und Pollard J.W. 1998). Einigkeit scheint jedoch darüber zu herrschen, daß pro-inflammatorische Cytokine wie z.B. TNF- α , IL-1 und IL-6 die Leydig-Zell-Steroidogenese dosisabhängig inhibieren (Hales D.B. 1996). Makrophagen interagieren direkt mit Leydig Zellen (Hales et al., 1999) und auch MIF ist ein wichtiger Bestandteil in der Hodenphysiologie (Meinhardt et al., 1999). (Weitere Wirkungen des Immunsystems auf den Hoden siehe auch 4.4). Alle diese Arbeiten zeigen deutlich die starke Vernetzung der drei großen Systeme im Hoden.

1.3 Störungen der großen Systeme können zu immunologischer Infertilität führen

So können bereits milde Infektionen und erst recht schwere Infektionskrankheiten Einfluß nehmen auf die Leydig Zell-Funktion und deren Testosteronproduktion (O'Bryan et al., 2000). Dies wird vermittelt durch das IL-1 System oder andere Cytokine, die eine ambivalente Aufgabe als Immunregulatoren und bei der Funktionserhaltung des Hodens haben (Huleihel et al.,

1997, siehe auch 4.4.4). Virale Infektionen, wie Mumps, können die Testosteronbildung inhibieren und so zu einer Infertilität führen (Le Goffic et al., 2003). Infertilität kann sich entwickeln nach bakteriellen Infektionen, die sich dann zu einer sekundären Orchitis ausweiten (von Schnakenburg et al., 2000, Izawa et al., 1999). Neben den veränderten Cytokinmustern sind aber auch Disbalancen der Immunzellen an der Entstehung immunologischer Infertilität beteiligt (siehe auch 4.3). Durch das neuro-endokrine System vermittelter „Streß“ kann negativen Einfluß nehmen auf die Fertilität von Männern (Kostic et al., 2000, Ozawa et al., 2002 und Hardy et al., 2002). Auch Herzinfarkt induzierte Streßsituationen können die Blut-Hoden-Schranke verändern und über Langzeiteffekte die Hodenphysiologie aus dem Gleichgewicht bringen, was sich negativ auf die Fertilität auswirkt (Mizushima et al., 2001).

1.4 EAO als Modell einer Autoimmunkrankheit des Hodens

Horror autotoxicus nannte Paul Ehrlich die Reaktion des Immunsystems gegen sich selbst. Gemeint sind die Folgen, wenn das Immunsystem von der Selbst-Toleranz in die Autoimmunität umschlägt.

Autoimmunkrankheiten lassen sich einteilen nach ihrer Ausbreitung:

- a) systemische Autoimmunkrankheiten, dazu gehören z.B. der Lupus erythematoses
- b) gewebe- oder organspezifische Autoimmunkrankheiten, wie z.B. rheumatische Arthritis oder die Autoimmun-Orchitis.

Alternativ werden Autoimmunkrankheiten eingeteilt nach ihrem immunpathogenen Mechanismus:

- a) die Bildung von Antikörpern gegen Oberflächen- oder Matrixantigene, wie z.B. die autoimmune Thrombopenie
- b) die Immunkomplexerkrankungen, zu der auch der systemische Lupus erythematoses zählt,
- c) die T-Zell-vermittelten Erkrankungen, zu denen der insulinabhängige Diabetes mellitus gehört.

Generell lassen sich Autoimmunkrankheiten durch folgende Charakteristika erfassen:

1. Die Anwesenheit von IgG Autoantikörpern und/oder autoreaktiven T-Zellen, die spezifisch sind für die Antigene des betroffenen Organs oder Organsystems. Dieser Befund sollte einhergehen mit der funktionellen oder morphologischen Beeinträchtigung des Organs oder Organsystems.

Da aber auch Antikörper gegen körpereigene Strukturen durch Trauma oder Infektionen hervorgerufen werden können, ohne daß autoimmune Reaktionen folgen müssen, ist ein weiterer Punkt zur Definition herangezogen worden.

2. Die Möglichkeit diese funktionellen oder morphologischen Veränderungen durch den Transfer von autoreaktiven Antikörpern und/oder T-Zellen in einem entsprechenden Empfänger zu induzieren.

Als Empfänger dienen bei der Erforschung von Autoimmunkrankheiten oft Tiere mit einer genetischen Prädisposition. So verwendet man spezifische Mauslinien bzw. die Lewis Ratte für die Induktion der Experimentellen-Autoimmun-Orchitis (EAO). Gegenstand vieler Untersuchungen war es, herauszufinden worin die Prädisposition begründet liegt. Außerdem konnte gezeigt werden, daß die Thymektomie in neonatalen Mäusen, ohne weitere Manipulation zur Entwicklung einer Autoimmunkrankheit und einer veränderten Entwicklung von CD4/CD25-Regulatorzellen führt (Lipscomb et al., 1979, Tung et al., 1987, Roper et al., 2002, Roper et al., 2003 und Bagewant et al., 2002). Die Regulation der T-Zellkontrolle hängt bei Mäusen mit dem H2-D Locus (human MHC I) zusammen (Teuscher et al., 1990) und diese Prädispositionen für die EAO wurden mit Orch1-5 benannt (Roper et al., 1998). Zu der genetischen Prädisposition gehört auch eine veränderte Kontrolle der Histaminausschüttung nach der Stimulation mit Pertussistoxin (PTX), was zur Bezeichnung BPhs Locus des genetischen Markers auf dem Mäusechromosom 6 führte (Teuscher et al., 1985). Ein weiterer die Histaminausschüttung modulierender Locus der die T-Zellantwort über die Veränderung von Chemokinausschüttungen (MCP-1) beeinflusst, wurde mit Hrh1 gekennzeichnet (Ma et al., 2002 und Teuscher et al., 1999). Diese genetischen Prädispositionen entstehen u.a. durch Sequenzmutationen die durch retroviral induzierte Mutationen auf die Genotypen dieser Mauslinien Einfluß nehmen (Teuscher et al., 1987).

Der MHC-Komplex, einer der zentralen Komplexe im Immunsystem ist gleichzeitig der dem Polymorphismus am stärksten unterliegende Rezeptor unseres Genoms und einer der wesentlichen Faktoren für eine genetische Prädisposition (Teuscher et al., 1985., Zhou et al., 1989 und Snoek et al., 1998).

Sequenzmutationen und Polymorphismen spielen oft in unterschiedlichen Autoimmunerkrankungen eine Rolle, wodurch die Loci Orch-3 und Orch-5 auch die Namen Idd4 und Idd5 erhielten, was auf ihre Rolle bei der Entwicklung eines insulinabhängigem Diabetes mellitus hinweist (Meeker et al., 1995); Orchitiden sind bei Diabetikern ein auch in der Klinik beobachtetes Phänomen (Sainio-Pollanen et al., 1997). Eine voneinander unabhängige genetische Kontrolle der

T_H1 und T_H2 Antworten, die auch mit dem H2 Locus nicht direkt gekoppelt ist, konnte Tokunaga et al., (1993 a und b) beschreiben.

Dies zeigt, daß eine Vielzahl von Genen und deren Sequenzunterschiede zu einem Genotyp führen, der erst durch das komplette Zusammenspiel aller Faktoren zu einer Prädisposition für bestimmte Krankheiten führt (Gao et al., 2003). Aber auch die Umwelt und ihre Einflüsse (Ernährung und durchlebte Infektionen) auf den Organismus sind nicht zu vernachlässigende Größen (Teuscher et al., 1998). Das zeigt eine Konkordanzrate von 40-50% für eineiige Zwillinge mit den entsprechenden MHC-Allelen, die für eine Diabetisentwicklung prädisponieren (Passarge 1994).

1.5 Das Tiermodell


Die EAO wurde in Ratten induziert. Als Induktionsmodelle dienten eine Stichtraumatisierung, bei der ein möglicher sympathischer Effekt auf den kontralateralen Hoden, d.h. eine Übertragung der EAO vom ipsilateralen, primär geschädigten, Hoden auf den kontralateralen zunächst nicht geschädigten Hoden, untersucht werden sollte. Weiterhin wurde die EAO durch Immunisierung mit syngenen Hodenhomogenat und Adjuvansien (mit und ohne bakterielle Epitope) ausgelöst.

Die verwendeten Rattenstämme waren Wistar (Auszucht) für den Vorversuch, Wistar/Kyoto (Inzucht) und Lewis (Inzucht). Die Tiere wurden in allen Versuchen nach folgendem Schema behandelt und benannt.

Tabelle 2: Tiermodell

Benennung der Gruppen und Abkürzung	Behandlung der Gruppen
Kontroll-Tiere (KO)	Diese Tiere wurden gänzlich unbehandelt unter gleichen Bedingungen wie die behandelten Versuchstiere gehalten
Adjuvans-Tiere (A)	Diesen Tieren wurde in den Versuchsreihen, bei denen die EAO-Induktion ohne bakterielle Epitope erfolgte, zur Abklärung möglicher Wirkungen des Adjuvans, die Immunisierungslösung ohne Hodenhomogenat verabreicht
Mit Hodenhomogenat immunisierte -Tiere (HH)	Diesen Tieren wurde zur Induktion der EAO syngenes Hodenhomogenat mit GERBU-Adjuvans injiziert, ohne bakterielle Epitope subcutan in die linke Leiste

Tabelle 2: Tiermodell

Benennung der Gruppen und Abkürzung	Behandlung der Gruppen
Tiere ohne Toxin (ohne Toxin)	In den Versuchsreihen, bei denen die EAO-Induktion mit bakteriellen Epitopen unterstützt wurde, wurden diesen Tieren die Injektionslösungen ohne bakterielle Epitope gespritzt, subcutan gangliennah und in die hinteren Fußballen.
Tiere mit Toxin (mit Toxin)	In den Versuchsreihen, bei denen die EAO-Induktion mit bakteriellen Epitopen unterstützt wurde, erhielten diese Tiere die Injektionslösungen mit bakteriellen Epitopen subcutan gangliennah und die hinteren Fußballen, sowie i.v. in die Schwanzvene.
Traumatisierte Tiere (T)	Diesen Tieren wurde zur Induktion der EAO, mit einem möglichen sympathischen Effekt auf den kontralateralen Hoden, in den rechten Hoden unter leichter Narkose ein Sternstich zugefügt
Die Ratten wurden mit einem Gewicht von 180-220g in den Versuch aufgenommen und nach 25, 35, 50 Tagen bzw. 80 Tagen getötet. Verbunden mit der entsprechenden Behandlungsgruppe s.o. wurden sie mit „25, 35, 50“ bzw. „80 Tage Tiere“ bezeichnet.	

Die EAO-Evaluation erfolgte mittels H.E.-Färbung an Gewebeschnitten und Durchlichtmikroskopie. Als EAO positiv wurden Hoden mit starken Zellinfiltrationen und/oder degenerierten Tubuli seminiferi gewertet (siehe auch 3.3.2).

Genaue Zusammensetzungen der Injektionslösungen siehe 2.2.1.3.

1.6 Die Ziele dieser Arbeit lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1) Etablierung eines Tiermodells der EAO am Beispiel der Ratte:

Zwei Modelle, Immunisierung mit Hodenhomogenat und Stichtraumatisierung eines Hodens, werden zur EAO-Induktion ausgewählt. EAO-Hoden und im besonderen die sympathische EAO sollen untersucht werden.

2) Beurteilung des Schweregrades und Markersuche der EAO anhand von Gesamtkonstitution, Organgewichten und Spermienmorphologien.

3) Untersuchung der Beteiligung des Immunsystems bei der Pathogenese der EAO.

4) Das Aufzeigen von möglichen neuen Kandidatengenen, die während der EAO differenziell exprimiert sind.

5) Die Identifikation von immundominanten Auto-Antigenen

6) Die Beteiligung der hypothalamisch-hypophysären-adrenalen-Achse an der Pathogenese der EAO

Schlüsselwörter:

Hoden, Orchitis, Experimentelle Autoimmun-Orchitis (EAO), EAO-Modell, Immunzellen, Cytokine, differenzielle Expression, Autoantikörper, Autoantigene.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte und Zubehör

Zentrifugen:

Heraeus Funktional line (Heraeus, Hanau)
Biofuge fresco (Kendro Laboratory Products, Osterode)
Ultrazentrifuge Beckmann L8 - 70M (Beckmann, München)
Vacuum Concentrator (Bachofer, Reutlingen)

Waagen:

Grobwaage Sartorius 1213MP (Sartorius GmbH, Göttingen)
Feinwaage Sartorius 2001MP2 (Sartorius GmbH, Göttingen)
„Tierwaage“ Mettler Typ3 (Mettler, Gießen)

Inkubatoren:

Zur in-situ-Hybridisierung: Cellstar (QUEUE Systems INC., Ashville, USA))
Für morphologische Arbeiten: Haraeus Typ T6 (Heraeus, Hanau)
Jouan EU - 18 (Jouan, Unterhaching)
Für die Zellkultur: Hera Cell (Heraeus, Hanau)
Schüttelinkubator für Bakterienkulturen: Ceromat H/HK
(Braun Biotech. International, Melsungen)
Für molekularbiologische Arbeiten: Hybridisierungsöfen MKII
(MWG BWG Biotech, Ebersberg)

Geräte für die Morphologie:

Einbettautomat Tissue Tek VIP Model E150/300 (Vogel, Gießen)
Einbettungskonsole Model 4715 (Sakura Finetx, Zoeterwoude, Niederlande)
Cryokonsole Model 4714 (Sakura Finetx, Zoeterwoude, Niederlande)
Schlittenmikrotom Leica SM 2000 R (Leica Instruments GmbH, Nussloch)
Wasserbad für die Schnitteraufnahme (W.Pfennig El.Med Apparatebau, Kiel)
Streckbänkchen (Medax Nagel, Kiel)
Kryomikrotom Jung Frigocut 2800 E (Reicher Jung, Nussloch)

Elektrophorese - und Blotting - Kammern sowie Powersupplygeräte:

Powersupply Novex Power Ease 500 mit x-cell-IITM Blotmodul
(Novex, San Diego, USA)
VoKam SAE 2761 Powersupply (Shandon, Scientific CO.LTD., London)
Trans-Blot SD (BIORAD, München)
Minigelapparatur für PAGE (Keutz, Reiskirchen)
Gelapparatur für PAGE, Größe 20x 17,5 cm
(Eigenbau, Werkstatt der Univ. Marburg)
Pharmacia Gel Electrophoresis Aparatus GNA 100 und 200
(Pharmacia Biotech, Hamburg)
Gene Powersupply GPS200/400 (Pharmacia Biotech, Hamburg)
Elektrophorese Powersupply EPS 200 (Pharmacia Biotech, Hamburg)
Vakuumblotter Model 785, incl. Pumpe (BIORAD, München)

Wasserbäder und Schüttler:

Drehschüttler Heidolph REAX 2000 (Heidolph Instruments GmbH, Schwabach)
Thermomixer 5437 (Eppendorf, Hamburg)
Schüttelwasserbad Typ 3042 (Köttermann, Uetze Hänigsen)
Celloshaker variospeed (Renner GmbH, Dannstadt)

PCR - Geräte:

peQ Lab Cyclon^R Gradient (peQ Lab Biotechnologie GmbH, Erlangen)
Peltier Thermal Cycler Model PTC - 200 mit Hybridisierungsaufsatz
(MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA)

Optische Geräte:

LKB Pharmacia Ultraspec III (LKB Biochrome, Cambridge)
LKB Ultraspec K (LKB Biochrome, Cambridge)
Mikroskop Leica DMLS (Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar)
Leica DMRE mit DMRD und DMRXE Software
(Leica Mikroskopie & Systeme GmbH, Wetzlar)
Panasonic Kamera wv-CL700 (Panasonic, Wiesbaden)
Sofortbildkamera Polaroid Mp 4 Land Camera (Polaroid, Cambridge, UK)
Transilluminator UVP (MAGV GmbH, Rabenau)
Liquid Scintillation counter Wallac1410 (Pharmacia Biotech, Hamburg)

Sonstige:

Membra Pure Anlage zur Wasseraufbereitung
(Membra Pure GmbH, Bodenheim)
Ultra - Turrax (Janke und Kunkel IKA WERK, Staufen)
Sterile Banch für Zellkulturarbeiten Hera safe (Heraeus, Hanau)
Shandonsystem zur immunhistochemischen Färbung:
Sequenzas Kassetten incl. Aufsätzen (Shandon, Pittsburg, USA)
UV - Crosslinker Fluo Link TFL20M (MWG Biotech, Ebersberg)
pH Meter CG 840 (Schott Geräte GmbH, Hofheim)
Rührer mit Wärmeplatte Typ MR1
(Heidolph Instruments GmbH & CoKG, Schwabach)
-86°C Freezer Model 958 (Forma Scientific Inc., Marietta, Ohio, USA)
Mikrowelle HMT830B (Bosch, München)

Nachfolgend werden diese Geräte nur noch in Kurzform erwähnt.

2.1.2 Elektronische Dokumentation und Datenverarbeitung, sowie statistische Analysen

2.1.2.1 Programme

Zur Datenerfassung und -aufbereitung: Programme des Microsoft Office Paketes (Word, Power Point und Excel)

Zur Quantifizierung der Immunzellpopulationen: C.A.S.T.-Grid (The Computer Assisted Stereological Toolbox), Interactivision, Silkeborg, Dänemark.

Zur Auswertung des Atlas Arrays: Image Gauge, Software des Imaging Systems Fuji FLA-30006

Zur densitometrischen Auswertung der RT-PCR-Amplificate: Scion Image Beta 4.0.2, Scion Corporation, Frederik, Maryland, USA

Für alle statistischen Auswertungen: Sigma Stat 2.0, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA

2.1.2.2 Häufig verwendete Internetadressen

BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)

SwissModell (<http://www.expasy.ch/sw3d/>)

PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/>)

Literatursuchmaschine (<http://www.pubcrawler.ie>)

2.1.3 Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Die Reagenzien waren von höchstmöglichem Reinheitsgrad und wurden, wenn nicht anders aufgeführt, von den Firmen Gibco BRL (Berlin), Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen), Serva (Heidelberg), Fluka (Seelze) und USB (Bad Homburg) bezogen. Die Trägermembranen stammten von Boehringer (Mannheim) und Pall BioSupport (Dreieich). Das Plastikverbrauchsmaterial wurde von Greiner (Nürnberg), Schleicher & Schuell (Dassel), Eppendorf (Hamburg), Sarstedt (Nümbrecht) und Nunc GmbH & Co.KG (Wiesbaden) bezogen.

2.1.4 Enzyme, Fertigpuffer, Antibiotika, Kits und Marker

2.1.4.1 Enzyme und Fertigpuffer:

Die Enzyme wurden von Pharmacia (Freiburg), Promega (Heidelberg), Pan Systems (Nürnberg), Vector (Burlingham, SC, USA), Serotec (Düsseldorf), Perkin Elmer (Branchburg, NJ, USA), Qiagen (Hilden), Pierce (Bonn), Applied Biosystems (Branchburg, NJ, USA) bezogen. Fertigpuffer und Medien stammten von den Firmen Invitrogen (Paisley, UK) und PAA Laboratories GmbH (Cölbe).

2.1.4.2 Antibiotika

Ampicillin

Boehringer, Mannheim

Penicillin-Streptomycin

PAA Laboratories GmbH, Cölbe

2.1.4.3 Kits:

Atlas Pure Total RNA Labeling System

Clontech, Heidelberg

AtlasTM cDNA Expression Array (Rat 1,2)

Clontech, Heidelberg

RNeasy Mini Kit

QIAGEN, Hilden

QIA prep spin Miniprep Kit

QIAGEN, Hilden

RNA Labeling Kit

Boehringer, Mannheim

Super Signal

Pierce, Bonn

Vecta stain *Elite* ABC Kit

Vector Lab., Burlingame, CA, USA

DaKo Peroxidase-Kit

DaKo, Hamburg

2.1.4.4 Marker:

RNA-Ladder 0,24-9,5 kb

Gibco BRL, Berlin

DNA-Ladder 100bp

Invitrogen, Pasley, UK

DNA-Ladder 50bp

Invitrogen, Pasley, UK

High Mass DNA-Ladder

Invitrogen, Pasley, UK

Broad Range Protein Marker

Gibco BRL, Berlin

MultiMark Multi-Colored Standard

Gibco BRL, Berlin

Prestained SDS PAGE Standard, low range

Bio Rad, Richmond/ USA

2.1.5 Häufig verwendete Puffer und Lösugen

2.1.5.1 Puffer für Western Blot:

Blottingpuffer für Novex-Apparatur:

25 mM Bicine
25 mM Bis-Tris
0,8 mM EDTA
10% (v/v) Methanol

Blottingpuffer für Biorad-Apparatur:

48 mM Tris
39 mM Glycin
0,04% (w/v) SDS
20% (v/v) Methanol

Absättigungspuffer:

0,01 M Tris/HCl pH 7,5
0,15 M NaCl
5% (w/v) Magermilchpulver

Waschpuffer:

0,05 M Tris/HCl pH 7,5
0,25 M NaCl
3 mM EDTA
0,05% (w/v) Tween 20

Ponceau S:

0,2% Ponceau S (Serva, Heidelberg)
0,3% Trichloressigsäure
in A.dest

2.1.5.2 Puffer für mikrobiologische Arbeiten:

SOC-Medium:

5 g Hefeextrakt
20 g Trypton
0,5 g NaCl
10 ml 0,25 M KCl
20 ml 1 M Glucose
5 ml 2 M MgCl₂
mit H₂O ad 1 l, mit NaOH auf pH 7,0 einstellen und autoklavieren

LB-Medium:

5 g Hefeextrakt
10 g Trypton
10 g NaCl
mit H₂O auf 1 l auffüllen, mit NaOH auf pH 7,0 einstellen
und autoklavieren

LB-Agar:

LB-Medium
1,5% (w/v) Agar
autoklavieren

Ampicillin:

Stammlösung: 50 mg/ml in A.dest
Gebrauchslösung: 50 - 100 µg/ml

X-Gal:

Stammlösung: 20 mg/ml in Dimethylformamid
Gebrauchslösung: 40 µl pro Agarplatte (1:500)

IPTG:

Stammlösung: 200 mg/ml in H₂O
Gebrauchslösung: 4 µl pro Agarplatte (1:5000)

2.1.5.3 Puffer für die DNA-Präparation mittels alkalischer Lyse:

RNase-Stammlösung:

10 mg/ml RNase A in
10 mM TRIS
15 mM NaCl
pH 7,5
auf 100°C 15 min, langsam abkühlen lassen
bei -20°C lagern

Lösung 1:

50 mM TRIS
10 mM EDTA pH 8,0
autoklaviert
Lysozym 4 mg/ml
RNase A 400 µg/ml

Lösung 2:

0,2 M NaOH
1% SDS, sterilfiltriert

Lösung 3:

2,55 M K-Ac, pH 4,8 autoklaviert

2.1.5.4 Puffer und Lösungen für das Arbeiten mit RNA:

GTC-Lösung:

4 M Guanidinisotiocyanat
25 mM Natriumcitrat (pH7,5)
0,5% N-Laurylsarcosinat
0,1 M beta-Mercaptoethanol

10 x MOPS-pH 7,0:

0,2 M 4-Morpholino-propansulfonsäure
50 mM Na-Acetat
10 mM EDTA
ad entsprechendem Volumen mit RNase freiem H₂O
mit 10 M NaOH pH 7,0 einstellen
dunkel aufbewahren, nicht autoklavieren

Proben-Puffer:

0,75 ml Formamid
0,15 ml 10 x MOPS
0,24 ml Formaldehyd
100 µl H₂O
80 µl 1% Bromphenolblau

RNA-Gel (1%):

2,5 g Agarose
 in 216 ml RNase-freiem Wasser aufkochen
 im Wasserbad auf ca. 50°C abkühlen lassen
 +13 ml Formaldehyd (37%)
 +25 ml 10 x MOPS
 gut mischen und unter Abzug gießen
 30 min aushärten lassen

2.1.6 Versuchsbegleitende Injektionslösungen**2.1.6.1 Narkosemittel**

Ketavet 100 mg/ml, Pharmacia & Upjon GmbH, Erlangen
 Rompun 2% Wirkstoff Xylazinhydrochlorid, Bayer, Leverkusen

2.1.6.2 Adjuvansien

Gerbu Adjuvant 100, Gerbu Biotechnik GmbH, Gaiberg
 Mycobakterium Tuberculosis H37Ra lyophilisiert, Difco Laboratories Detroit, Michigan, USA
 Aktivkultur Bordetella Pertussis DSM4925 in Isopropanol abgetötet, DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH), Braunschweig

2.1.7 Bakterienstämme, Vektoren und Inserts**2.1.7.1 Bakterienstämme**

Als Bakterienstamm wurden die „Epicuran Coli^R SURE^R (Stop Unwanted Rearrangement Events) Competent Cells“ der Firma Stratagene GmbH, Heidelberg verwendet. Die Bakterien haben folgenden Genotyp: e14⁻(McrA⁻) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac recB recJ sbcC umuC::Tn5 (Kan^r) uvrC [F⁺proAB lacI^q ΔM15 Tn10 (Tet^r)].

2.1.7.2 Vektoren und Inserts**Tabelle 3: Plasmidkonstrukte und Bezugsquellen**

Insert und Größe (Genlocus)	Vector Schnittstellen- definition	Vectorhersteller	freundlichst überlassen von
IL-1 mit 1161bp	pMOS Blue Sense: T3 Xba I Antisen.: T7 EcoR I	Amersham	M. O'Bryan, Melbourne, Australien
IL-6 mit 534bp (4-554)	pCR II Sense: T7 BamH I Antisen.: Sp6 Xba I	Invitrogen	M. O'Bryan, Melbourne, Australien
IL-6 mit 220bp	pGEM-T Sense: T7 NOT I Antisen.: Sp6 NCO I	Promega	M. Bette Marburg

Tabelle 3: Plasmidkonstrukte und Bezugsquellen

Insert und Größe (Genlocus)	Vector Schnittstellen- definition	Vectorhersteller	freundlichst überlassen von
IL-10 mit 500bp (58-584)	pGEM-3Z Sense:T7 Hind III Antisen.:Sp6 KPN I	Promega	M. O'Bryan, Mel- bourne, Australien
MCP-1 mit 504bp (35-504)	pBluescriptIIKS(+/-) Sense: T7 Xba I Antisen.: T3 Hind III	Stratagene	M. O'Bryan, Mel- bourne, Australien
TNF- α mit 700bp (1-539)	pBluescriptIIKS(+/-) Sense: T7 Hind III Antisen.: T3 Bam HI	Stratagene	M. O'Bryan, Mel- bourne, Australien
TGF- β mit 950bp (914-1414)	pMOS Blue Sense: T3 Xba I Antisen.: T7 Kpn I	Amersham	M. O'Bryan, Mel- bourne, Australien

2.1.8 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten männliche adulte Ratten der Stämme Wistar (Auszucht), Wistar Kyoto (Inzucht) und Lewis (Inzucht). Bezugsquellen waren die Firmen Charles River Wiga GmbH (Sulzfeld) und Harlan-Winkelmann (Borchen). Die Tiere wurden mit etwa 200 g Körpergewicht geliefert und schnellst möglich in den Versuch aufgenommen. Während der Versuchszeit saßen die Tiere in einem klimatisierten Stall mit Tag-Nacht-Rhythmus, erhielten die übliche Standarddiät Altromin C1000 (Fa. Altromin GmbH, Lage/Lippe) und Wasser ad libitum.

2.2 Methoden

2.2.1 Tiermodell

2.2.1.1 Gewichtskontrollen der Ratten

Durch die Versuchsmanipulationen entstehende Konstitutionsveränderungen, die evtl. Einfluß auf das Versuchsergebnis haben könnten, sollten mit der Methode der Gewichtskontrolle und der visuellen und manuellen Untersuchung der Ratten vor Versuchsende ermittelt werden.

Um evtl. versuchsbedingte Gewichtsabnahmen zu erkennen, wurden die Tiere etwa eine Woche und ein weiteres mal einen Tag vor Versuchsende gewogen. Dazu wurden sie in einem Mäusekäfig auf einer Waage gewogen und die Gewichte dokumentiert und per Excel und SigmaStat ausgewertet. Diese Massnahme diente ebenfalls dazu, die Tiere etwas handzahmer zu machen, um am Tag des Versuchsendes möglichst wenig Stress entstehen zu lassen. Dies war wichtig, da allen Tieren der ersten Versuchsreihe Blut entnommen wurde, um verschiedene Parameter (Glukose, Corticosteron und Testosteron) zu bestimmen, die nicht durch Stress beeinflusst und somit verfälscht werden sollten.

2.2.1.2 Herstellung von Hodenhomogenat und Trockengewichtsbestimmung

Zur Herstellung des zur Immunisierung benötigten Hodenhomogenates wurden mehrere männliche Ratten durch Kohlendioxyd-Intoxikation getötet. Die Hoden wurden sofort entnommen und in TBS auf Eis aufbewahrt. Anschließend wurden die Hoden von der Kapsel befreit und mit einer Schere grob zerkleinert. Um die Autolyse möglichst gering zu halten, wurden diese Stücke dann weiterhin auf Eis und mit 1ml TBS pro Hoden mit einem Ultra-Thorax homogenisiert.

Zur Trockengewichtsbestimmung wurden zunächst die Eppendorf-Reaktionsgefäße (1,5ml) gewogen, 100µl Hodenhomogenat hineinpipettiert und nochmals gewogen. Nach der Trocknung des Homogenates in einer Vakuum-Zentrifuge wurden die Gewichte erneut bestimmt und das Trockengewicht errechnet. Danach wurde das Homogenat unter Berücksichtigung der in der Literatur empfohlenen (Zhou et.al.,1989) Mengen und der Größe der zu behandelnden Gruppen aliquotiert und bei -20°C aufbewahrt.

2.2.1.3 Herstellung der Immunisierungslösungen

Zur Etablierung des Tiermodells wurden unterschiedliche Lösungen verwendet.

Für alle Lösungen ist zu beachten, daß GERBU-Adjuvant 100 nicht mit phosphathaltigen Puffern zu verwenden ist, da sonst mit einem Kationenausfall zu rechnen ist, der nicht nur die Injektion der Lösung mit feinen Nadeln verhindert, sondern möglicherweise die Wirkweise des Adjuvanses beeinträchtigt. Alle Lösungen wurden steril angesetzt und injiziert.

Versuchsreihen 0 und I:

Immunisierungslösung: 100 mg Hodenhomogenat (w/w)
25 µl GERBU-Adjuvant100
ad 300 µl mit TBS
pro Tier

Adjuvanslösung: 25 µl GERBU-Adjuvant 100
ad 300 µl mit TBS
pro Tier

Versuchsreihe II:

Immunisierungslösung: 200 mg Hodenhomogenat (w/w)
25 µl GERBU-Adjuvant 100
ad 300 µl mit TBS
pro Tier

Adjuvanslösung: 25 µl GERBU-Adjuvant 100
ad 300 µl mit TBS
pro Tier

Versuchsreihe III:

Immunisierungslösung 1: 10 mg Hodenhomogenat (d/w)
450 µg Mycobacterium Tuberculosis H37Ra (d/w)
40 µl GERBU-Adjuvant 100
ad 360 µl mit TBS
pro Tier

Immunisierungslösung 2: 10 mg Hodenhomogenat (d/w)
40 µl GERBU-Adjuvant 100
ad 360 µl mit TBS
pro Tier

Immunisierungslösung 3: In Isopropanol getötete Bordetella Pertussis wurden bei 100000 x g für 30 min abzentrifugiert, das Pellet in TBS gewaschen und nochmals zentrifugiert. Die Gesamtmenge an Bakterien wurde in 20 ml sterilem TBS aufgenommen. Pro Tier wurden 500 µl Bakterienlösung, etwa 10^{10} Organismen, verabreicht.

2.2.1.4 Immunisierung

Für die Versuchsreihen 0 (Vorversuch zur Untersuchung der geeigneten Organfixation), 1 und 2 wurden die Tiere mittels Narkose ruhiggestellt und die Immunisierungslösungen mit 1ml Insulinspritzen und 27G Kanülen subcutan in die linke Leiste injiziert. Zur Verstärkung der Immunantwort wurden diese Immunisierungen zwei mal im zweiwöchigen Abstand wiederholt. Wobei die Lösungen 1 mit dem Hodenhomogenat, die Gruppen erhielten, die in dieser Doktorarbeit als immunisierte Tiere, Hodenhomogenat-Gruppe oder mit der Abkürzung HH benannt wurden. Die Lösungen 2 wurde den Gruppen der sogenannten Adjuvans Tiere, Adjuvans-Gruppe bzw. A injiziert, die als Kontrollen dienten.

Für die Versuchsreihe 3 wurden die Tiere mit jeweils 100 mg/kg Körpergewicht Ketamin plus 50 µl Rompun pro Tier narkotisiert. Die Gruppe der immunisierten Tiere erhielten pro Tier 360 µl Lsg.1, die wie folgt verteilt wurde: zunächst etwa 50 µl in jeden der hinteren Fußballen, die sofort mit einem Gewebekleber (Histoacryl/Braun, Melsungen) verschlossen wurden. Der Rest wurde auf vier subcutane Injektionen über den Rücken verteilt.

Alle Tiere bekamen zusätzlich eine Injektion der Lösung 3, die zuvor auf etwa 37°C erwärmt wurde, in die Schwanzvene. Nach exakt dem gleichen Verteilungsmuster bekam eine weitere Gruppe die Lösung 2 gespritzt, wobei auf die i.v. Injektion der Lösung 3 verzichtet wurde.

2.2.1.5 Traumatisierung

In den Versuchsreihen 0-2 wurden die Tiere, die zur Traumatisierten-Gruppe gezählt wurden, in eine leichte Narkose versetzt. Mit einer Kanüle (19GA11/2 1,1x40) wurde ein Sternstich in den rechten Hoden plaziert, um dort eine Traumatisierung des Hodengewebes hervorzurufen. Anschließend wurden die Tiere mit einem antibiotischen Sprühverband (Nebacetin N/ Wirkstoff Neomycinsulfat der Firma Gist - brocades Pharma GmbH, Heidelberg) versorgt. Die primär traumatisierten rechten Hoden wurden in dieser Arbeit als TR bezeichnet und die kontralateralen nicht traumatisierten Hoden als TL.

2.2.1.6 Versuchsende und Organentnahme

Nach den festgelegten Versuchszeiten (25, 35, 50 und 80 Tage nach der ersten Behandlung) wurden die Tiere getötet. Für die Versuchsreihe 0 wurden die Tiere in eine tiefe Narkose (Ketamin 200 mg/kg) gelegt. Blutproben wurden direkt aus dem Herzen gewonnen. Die Perfusion erfolgte über den linken Ventrikel und die Aorta, wobei zunächst der vorgewärmte Vorspüler perfundiert wurde, bis Lunge und Leber sichtbar blutleer waren. Anschließend wurde mit etwa 100-200 ml des entsprechenden Fixanzes nachgespült. Diesen Tieren wurden die Hoden entnommen und gewogen. Für weitere Forschungsprojekte und für die Verwendung in der Lehre wurden fast alle anderen Organe entnommen und weiterverarbeitet.

Für die Versuchsreihe 1 wurden die Tiere einzeln aus dem Tierhaus geholt und schnell „ohne Stress“ durch Dekapitation getötet. Dies war nötig, um die Serumhormone, die von diesen Tieren bestimmt werden sollten, möglichst wenig zu beeinträchtigen. Bei dieser Versuchsreihe wurden die Tiere direkt nach der Dekapitation ausgeblutet. Das gewonnene Blut wurde in dafür vorgesehenen Behältnissen mit Heparin und EDTA gesammelt und so für die Plasmagewinnung vorbereitet. Anschließend wurden den Tieren die Hoden, die Milz und der Thymus entnommen, gewogen und kryofixiert.

Bei den Versuchsreihen 2 und 3 wurden die Tiere durch eine Kohlendioxyd-Intoxikation getötet. Bei diesen Tieren wurde zunächst der Thorax gefenstert und durch eine Herzpunktion die maximale Blutmenge entnommen. Sofort danach wurden auch hier die Hoden, die Milz und der Thymus entnommen, gewogen und kryofixiert (siehe 2.2.2.1).

Alle entnommenen Gewebe wurden bei -80°C aufbewahrt.

2.2.1.7 Gewinnung von Normalserum

Das Blut wurde nach der Entnahme mindestens 20 min bei RT stehen lassen, bis sich der Blutkuchen vollständig ausgebildet hatte. Anschließend wurden die Proben mit einer Heraeus Laborzentrifuge für 20 min, bei RT und 2500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und erneut zentrifugiert. Das so gewonnene Serum wurde aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -20°C gelagert. Seren, die als Blockierungslösung bei der Immunhistochemie Verwendung fanden, wurden bei 56°C für 30 min inaktiviert.

2.2.2 Morphologische Methoden

2.2.2.1 Kryokonservierung

Zur Konservierung der Gewebe wurden verschiedene Fixanzen bzw. Intermedien bezüglich der Antigenerhaltung für immunhistochemische Nachweise getestet.

Folgende Lösung wurde für den Versuch 0 zur Perfusion und Fixierung der zur Kryokonservierung bestimmten Gewebe verwendet.

Fixanz mit Paraformaldehyd:

2% Paraformaldehyd
75 mM Lysine
10 mM Na-Perjodat
0,5% Glutaraldehyd

Nach der Perfusion der Tiere wurden die Hoden entnommen und für 24h bei 4°C immersionsfixiert. Anschließend wurden die Hoden in kaltem PBS mit 7% Sucrose gespült und weitere 24h bei 4°C darin inkubiert. Danach wurden die Gewebe in -30°C bis -40°C kaltem Isopenthan eingefroren und bei -80°C aufbewahrt.

Gewebe für die Kryokonservierung wurde in den Versuchen 1 bis 3 in -30°C bis -40°C kaltem Isopenthan eingefroren und bei -80°C gelagert. Auf weitere Fixanzen und Intermedien wurde verzichtet, um die Gewebe auch für RNA-Präparationen zur Verfügung zu haben. Dem Antigenerhalt der nachgewiesenen Strukturen geriet dies nicht zum Nachteil.

2.2.2.2 Herstellung von Kryostatschnitten

Die tiefgefrorenen Gewebe wurden für etwa 1h im Schneiderraum des Kryostaten auf -24°C erwärmt. Zur Befestigung wurden die Gewebe mit Tissue Tec (Miles/USA) auf die vorgekühlten Objekthalter geklebt und in die dafür vorgesehene Klemmvorrichtung eingeschraubt. Das Gewebe wurde bei einer Objekttemperatur von -24°C und einem Freiwinkel von ca.5° mit einem Mikrotommesser der Klasse C geschnitten. Die 5-10µm dicken Gewebeschnitte wurden auf zimmerwarme Objektträger aufgezogen und etwa 1/2h bei RT getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte bei -20°C aufbewahrt.

2.2.2.3 Fixation von Geweben zur Paraffineinbettung

Zur Konservierung der Gewebe in der Versuchsreihe 0 für die Paraffineinbettung wurden folgende Fixanzen zur Perfusion und Immersionsfixierung verwendet. Alle Hoden wurden nach etwa 1h Immersionsfixation in 4 Stücke geschnitten und weiter behandelt wie im Folgenden beschrieben.

A) Bouinsche Lösung:

15 Teile gesättigte Pikrinsäure
5 Teile Formalin
1 Teil Eisessig

Die Immersionsfixation wurde ü.N. bei RT fortgeführt. Anschließend wurden die Gewebestücke in 70% Ethanol mehrere Tage gewaschen, bis sich keine Pikrinsäure mehr löste. Dies wurde mit 80%igem Ethanol wiederholt. Zur Vorbereitung für die Einbettung der Gewebe wurden die Blöckchen dann wie folgt behandelt: 1h 90% Ethanol, 3h 96% Ethanol, 2h Isopropanol und nochmals frisches Isopropanol ü.N. bei RT.

B) Das alkoholische Bouinsche Gemisch oder Dubosqu Brasil:

150 ml 80% Ethanol
1 g Pikrinsäure
60 ml 37% Formol
15 ml Eisessig

Die Immersionsfixierung wurde ü.N. bei RT fortgeführt und danach so lange in 90% Ethanol (mehrere Tage) gespült, bis keine Gelbfärbung der Lösung mehr zu erkennen war. Mit 4h in 96% Ethanol, 4h in Isopropanol und nochmals frischem Isopropanol ü.N. bei RT wurden die Gewebestücke auf die Einbettung vorbereitet.

C) Formol:

a) 1+4 zur Perfusion
1 Teil 37% Formol
4 Teile Leitungswasser
b) 1+9 zur Immersionsfixierung
1 Teil 37% Formol
9 Teile Leitungswasser

Nach der Immersionsfixierung ü.N. bei RT wurden die Gewebestückchen in Kunststoffeinbettkassetten (Vogel, Gießen) gegeben, beschriftet und für einen halben Tag in fließendem Leitungswasser gewässert. Die vorbereitende Entwässerung zur Einbettung wurde wie folgt durchgeführt: 2h 50%, 2h 60%, ü.N. 70%, 1h 80%, 1h 90% und 3h in 96% Ethanol sowie 2h und einmal ü.N. in Isopropanol.

Bei allen Immersionsfixierungen wurden die Gewebestücke 1h nach dem Schneiden in Mullsäckchen verpackt und etwa in die halbe Höhe der Fixiergefäße gehängt. Die Gewebestücke wurden erst zur Einbettung, wenn nicht anders erwähnt, in entsprechende Kunststoffeinbettkassetten verbracht.

2.2.2.4 Paraffineinbettung und Herstellung von Paraffinschnitten

Die Gewebe für den Versuch 0 wurden von Hand eingebettet. Als Intermedium diente Isopropanol, die Inkubation erfolgte ü.N. bei RT. Die Einbettung wurde mit Paraffinen mit steigenden Schmelzpunkten (42-58°C jeweils 8h) bei 60°C im Wärmeschrank durchgeführt. Die Proben wurden mit geschmolzenem HISTO-COMP Gewebeeinbettmittel, Schmp. 56°C, (Vogel/Gießen) in Blöckchen gegossen.

Alle weiteren Gewebe wurden mit einem Einbettautomaten (Tissue Tek) eingebettet und anschließend an der Ausgießstation (Sakura) in die dafür vorgesehenen Ausgießwännchen gegossen und mit den Unterteilen der Kunststoffeinbettkassetten (Vogel, Gießen) als Sockel versehen. Dieser läßt eine leichte Beschriftung und ein besseres Fixieren in den Klemmvorrichtungen der Mikrotome zu.

Zur Herstellung von Gewebeschnitten wurden die ausgehärteten Paraffinblöckchen auf ein Schlittenmikrotom (Leica, Nussloch) gespannt und mit Einmalmessern (Leica, Nussloch) 5µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden in ein Wasserbad überführt und auf einen Objektträger aufgezogen. Die Glättung der Schnitte erfolgte auf einem beheizten Streckbänkchen (Medax Nagel, Kiel) bei der Einstellung 3-4. Die Fixierung der Gewebe auf den Objektträgern erfolgte 24h bei 42°C im Wärmeschrank.

2.2.2.5 Objektträgerbeschichtungen

Zur besseren Haftung der Gewebe auf den unbeschichteten Objektträgern (Mariefeld Superior) wurden diese zuvor beschichtet. Folgende Varianten standen zur Verfügung:

A) Chromalaun-Gelantine-Beschichtung: 0,3g Blattgelatine mit 100ml A. dest. und 0,05g Chromalaun erwärmen und lösen, die OTs damit beschichten und 1h im Trockenschrank bei 37°C austrocknen.

B) Silanisierung: Die OTs werden bei RT für 10 min in eine 3%ige APES-Lsg. (3-Aminopropyltriethoxysilane von Fluka) in Aceton gestellt, anschließend sehr gut in A. Dest. gespült und ü.N. bei 80°C im Trockenschrank getrocknet.

2.2.2.6 Gewinnung von Nebenhodenspermien und Herstellung von Spermienausstrichen

In der Versuchsreihe 2 wurden den Tieren zusätzlich die Nebenhoden entnommen und bis zur weiteren Präparation in Homogenisierungspuffer auf Eis aufbewahrt.

Homogenisierungspuffer: 10mM Tris-HCl, pH 7,4, 1M EDTA und 250mM Sucrose.

Von den Nebenhoden wurde jeweils die Cauda-Epididymidis weiterverarbeitet. Diese wurden in Stücke geschnitten und in Homogenisierungspuffer ausgewaschen. Die gewebefreien Lösungen wurden bei 600 x g für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Die Spermien bilden das Pellet und können bei Bedarf noch einmal gewaschen werden.

Zur Untersuchung wurden die Spermien auf APES-beschichtete OTs ausgestrichen, ü.N. bei RT getrocknet, fixiert und mit Hämalaun (siehe 2.2.2.7D) gefärbt.

2.2.2.7 Färbungen

Zur Darstellung unterschiedlicher Strukturen wurden jeweils geeignete Färbungen herangezogen. Paraffinschnitte wurden dazu zunächst mit Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe (100- 50%) jeweils 5min rehydriert und in A. dest. überführt. Kryoschnitte wurden aus -20°C in 4°C kaltes Isopropanol gestellt und für 20 min bei 4°C fixiert, bevor sie in Puffer oder A. dest. überführt wurden. Folgende Färbungen wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit angewandt.

A) Hämatoxilin-Eosin-Färbung:

Diese Übersichtsfärbung wurde in unserem Projekt zur histologischen Begutachtung und Einstufung der sich entwickelnden EAOs herangezogen. Die Kernfärbung erfolgte mit Mayers Hämalaun (Merck/Darmstadt) für 10 min, spülen in A. dest. und 10-15 min bläuen mit Leitungswasser. Gegengefärbt wurde mit Eosin. Hierzu wurde 1g Eosin G (Merck/Darmstadt) in 100ml A. Dest. gelöst, filtriert und vor Gebrauch mit einem Tropfen Essigsäure pro 100ml angesäuert. Die Färbedauer betrug etwa 1 min. Gespült wurde in A. dest., differenziert mit 96%igem Alkohol. Anschließend wurde mit 100%igem Alkohol und Xylol völlig entwässert und in Corbit eingedeckt.

Färbeergebnis: Zellkerne blau, alle anderen Strukturen in verschiedenen Rotnuancen.

B) Hämatoxilin-Färbung:

Diese Färbung wurde zum Anfärben der Spermienausstriche verwendet. Hierzu wurden die Spermienausstriche für 5 min in A. dest. eingestellt und für etwa 1 min in Mayers Hämalaun (Merck/Darmstadt) gefärbt. Das Bläuen und Entwässern, sowie das Eindeckeln erfolgte wie unter Punkt A. Färbeergebnis: Zellkerne bzw. Spermienköpfe blau

C) Azan-Färbung:

Diese Färbung erhielt ihren Namen von den maßgeblichen Färbebestandteilen Azokarmin und Anilinblau. Sie wird neben der Hypophysendarstellung hauptsächlich, und auch in unserem Projekt, als Bindegewebsfärbung verwendet. Folgende Lösungen werden benötigt:

1) 0,1g Azokarmin G (Merck) in A. Dest. wurden aufgeköcht, filtriert und zu dem Filtrat wurde 1ml Eisessig gegeben.

2) 100ml 90%iger Alkohol wurden mit 0,1 ml Anilinöl gemischt.

3) 100ml 96%iger Alkohol wurden mit 1 ml Eisessig versetzt.

4) Für die Azanlösung wurden 0,5g Anilinblau (wasserlöslich), 2 g Orange G und 8g Eisessig in 100ml Wasser gekocht und anschließend filtriert.

Die Färbung wurde folgendermaßen durchgeführt. Nach der Entparaffinierung und Hydratisierung wurden die Schnitte 10-15 min in 56°C warmen Azokarmin gefärbt, in Wasser gespült und in Anilinalkohol differenziert, bis die Kerne deutlich erkennbar waren. Die Differenzierung wurde in Eisessig-Alkohol abgebrochen. Das Bindegewebe wurde für 3-6h in 5%iger Phosphorwolframsäure entfärbt und gebeizt und dann in Wasser gespült. Gegengefärbt wurde für 0,5 bis 2 min in der Azanlösung und anschließend wurde in Wasser gespült, dann ein weiteres mal in 96%igem Alkohol differenziert, anschließend entwässert und mit Corbit eingedeckt.

Färbeergebnis: kollagenes und retikuläres Bindegewebe tief blau, Zellkerne rot, Muskulatur rötlich-orange.

D) Giemsa-Färbung:

Diese Färbung erlaubt eine Beschreibung einzelner Zellpopulationen auf Grund der unterschiedlich angefärbten Granula und wurde in diesem Projekt zur Detektion der Mastzellen im Hoden verwendet. Sie wurde mit der Giemsa-Stammlösung von Merck durchgeführt. Nach dem Entparaffinieren und Entwässern wurden die Schnitte zwei mal in abgekochtes A.dest. eingestellt, danach in 1:50 mit abgekochtem A. dest. verdünnte und frisch angesetzte Giemsa-Stammlösung gestellt und etwa 2 h gefärbt. Differenziert wurde in mit Eisessig angesäuertem A. dest. und 96%igem Alkohol, bis keine Farbwolken mehr entstanden. Entwässert wurde dann nur noch in Isopropanol und Xylol und folgend wurden die Schnitte mit Corbit eingedeckt.

Färbeergebnis: Kerne und Plasma dunkelblau, Bakterien blau, eosinophile Granula, Erythrozyten und Bindegewebe hellrot-rotorange, Mastzellgranula purpurrot.

2.2.2.8 Immunhistochemische Nachweise

Mit dieser Methode lassen sich antigene Determinanten, die für bestimmte Zellen oder Zellstrukturen charakteristisch sind, mit Hilfe spezifischer Antikörper nachweisen. Die Detektion der einzelnen Epitope gebietet je nach Gewebe und Vorbehandlung unterschiedliche Vorgehensweisen.

Für alle Nachweise wurden in Paraffin eingebettete Gewebe zunächst in Xylol deparaffiniert und mit einer absteigenden Ethanolreihe (96%, 80%, 70% und 60% für je 5min) bis hin zu A. dest. rehydriert. Kryokonservierte Gewebe wurden direkt aus -20°C in 4°C kaltes Isopropanol gestellt und für 10 min fixiert, anschließend in A. dest. gespült.

A) Antigenfreilegungspuffer und Mikrowelle:

Benötigte Lösungen:

Antigenfreilegungspuffer:

10 mM Citronensäure-Monohydrat
pH auf 6,0 mit NaOH

1 x TBS:

8,77 g NaCl
24,4 g Tris
ad 100 ml mit A.dest.

Die vorbereiteten Schnitte wurden zur Epitopfreilegung in speziellen mikrowellengeeigneten Küvetten mit Antigenfreilegungspuffer vollständig bedeckt und in der Mikrowelle für 2 min mit 800 W und 8 min mit 270 W (Defrost) behandelt. Die Schnitte wurden in der Küvette etwa 20 min abgekühlt und anschließend 2 x 5 min in 1x TBS gespült. Zur Inaktivierung der endogenen Peroxidasen wurden die Schnitte für 5 min, im Dunkeln, in 3% H₂O₂ in A.dest. inkubiert und

anschließend 2 x 5 min in 1 x TBS gewaschen. Die unspezifischen Bindungsstellen wurden durch die Inkubation mit 1 x Rotiblock (Roth, Karlsruhe) für 30 min bei RT, in einer feuchten Kammer, abgesättigt. Die 1. AK-Bindung erfolgte ü.N. bei 4°C, bei der für den Antikörper entsprechenden Verdünnung (siehe Tabelle 4:) in 1 x Rotiblock in einer feuchten Kammer.

Am zweiten Versuchstag wurden die Schnitte zunächst für 1 x 5min in 1 x TBS (0,1% Tween) und 2 x 5 min 1 x TBS von ungebundenen 1. AKn befreit, um die Inkubation mit dem 2. AK (Ziege-anti-Maus-AP, SIGMA) 1:800 in 1% Normalziegenserum in TBS für 1h bei RT in einer feuchten Kammer zu ermöglichen. Zur Hintergrundreduktion wurden die Schnitte wie bereits beschrieben in TBS/Tween und TBS gewaschen. Die Detektion erfolgte mit Hilfe des Farbstoffes Fast RedTM von SIGMA (genaue Anleitung siehe Packungsbeilage), der durch die an den 2. Antikörper gebundenen alkalischen Phosphatase in einen himbeerroten Niederschlag umgesetzt wird. Die Schnitte wurden mit Meyers Hämatoxilin gegengefärbt und wegen der Instabilität des Farbstoffes in Alkoholen, wässrig in Kaisers Glycerin-Gelantine (Merck) eingedeckt.

B) Immun-Fluoreszenz-Nachweis:

Die vorbereiteten Schnitte wurden kurz in TBS gespült und dann die unspezifischen freien Bindungsstellen für je 30 min bei RT einmal in 1 x Rotiblock und einmal in 10% FKS/ 10% NGS in TBS abgesättigt. Die 1. AK-Inkubation erfolgte in 1% NGS in TBS bei RT in einer feuchten Kammer für 1,5h. Danach wurden die Schnitte 1 x 5min in 1 x TBS(0,1% Tween) und 2 x 5 min in 1 x TBS gewaschen. Die Inkubation mit dem 2. AK (Ziege-anti-Maus-Cy2 oder -Cy3) 1:200 in TBS erfolgte bei RT für 30 min in einer abgedunkelten feuchten Kammer.

Die Schnitte wurden in Propylgalat oder Vecta Shield Mounting Medium mit DAPI (VECTOR Laboratories, Burlingame, CA, USA) eingedeckt.

C) Avidin-Biotin-Complex (ABC)-Technik mit dem Vecta stain *Elite* ABC Kit:

Benötigte Lösungen:

PBS:

140 mM NaCl
2,5 mM KCl
6,5 mM Na₂HPO₄
1,5 mM K₂HPO₄
pH 7,4

PBS/BSA/Azid:

1% (w/v) BSA
0,1% (w/v) Natriumazid
in PBS, pH 7,2

Biotinstammlösung:

10 mg Biotin
10 ml PBS
0,1% (w/v) Natriumazid

Avidinstammlösung:

1 mg Avidin
1 ml PBS
0,1% (w/v) Natriumazid

Die vorbereiteten Schnitte wurden 3 x 5 min in 1 x PBS gespült, anschließend wurden die endogenen Peroxidasen mit Phenylhydrazin (50 µl in 100 ml PBS) für 20 min bei RT abreagiert und wie oben beschrieben in PBS gespült. Zur schnelleren Versuchsdurchführung wurden die Objektträger mit speziellen Coverplates in Sequenzas-Kassetten (Shandon, Pittsburg, USA) eingespannt und der Sitz mit einer PBS-Spülung überprüft. Danach wurden die Schnitte mit dem 1. AK in der jeweiligen Verdünnung in PBS/BSA/Azid und Avidinstammlösung 1:300, incl. 5% NHS, überschichtet und ü.N. bei 4°C inkubiert. Am zweiten Tag wurden die Schnitte 3 mal mit PBS gespült, dabei wurden die Vorratsbehältnisse des Systems 3 mal gefüllt. Dann

mit dem 2. AK (Pferd-anti-Maus-biotiniliert aus Kit) 1:200 in PBS incl. Biotinstammlösung 1:50 und 5% NRS überschichtet. Gleichzeitig wurde die Avidin-Biotin-Lösung jeweils 1:50 in PBS angesetzt, um die Komplexbildung zu ermöglichen. Die Inkubation erfolgte 30 min bei RT. Die 2. AK-Lsg. wurde wie oben beschrieben mit PBS abgespült und durch die Avidin-Biotin-Lösung ersetzt und ebenfalls 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Objektträger aus dem System genommen und in Glasküvetten mit 1 x PBS gestellt und noch weitere 2 mal gewaschen. Die Detektionsreaktion erfolgte mit DAB unter Sichtkontrolle (DAB-Tabletten, Sigma, nach Packungsbeilage angesetzt und mit 12 µl 30% H₂O₂ aktiviert). Die Färbung wurde mit A. dest. gestoppt und die Schnitte noch weitere 3 mal mit A. dest. gespült. Die DAB-Lsg. wurde mit Na-Hypochlorid inaktiviert. Die Gegenfärbung erfolgte mit Meyers Hämalaun (Merck) für 10 sec und einer anschließenden Bläuung von 10 min in Leitungswasser. Zur Konservierung wurden die Schnitte mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (60%, 80% und 96%) sowie Isopropanol und Xylol entwässert und auf das Eindeckmedium Corbit-Balsam (Hecht, Kiel) vorbereitet.

Tabelle 4: Verwendete 1. Antikörper

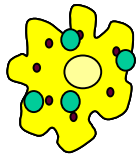
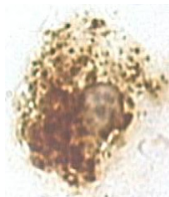
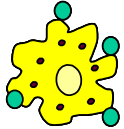
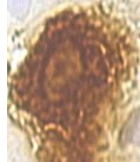
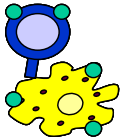
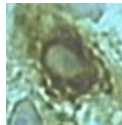
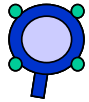


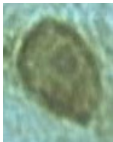
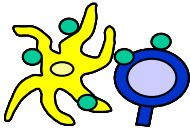
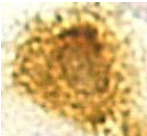


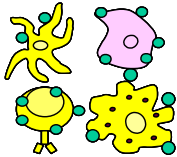


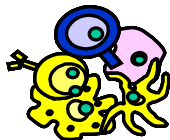
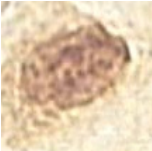

Antigen-lokalisation	Kurze Beschreibung (alle von Serotec) und verwendete Arbeits-Verdünnung	Nachweis
	Klon-Nr: ED1 Der ED1 Ak erkennt ein einkettiges Glykoprotein von 90-100 kD, welches hauptsächlich auf den Lysosomenmembranen myeloider Zellen exprimiert wird, im Hauptanteil der zirkulierenden Gewebsmakrophagen und peripheren Blutzellen. ED1 ist homolog zu Makrosialin der Maus und CD68 des Menschen. 1:500	
	Klon-Nr: ED2 Dieser Ak reagiert nur mit Membranproteinen residenter Gewebemakrophagen der Ratte mit den Größen 175,160 und 95kD. 1:500	
	Klon-Nr: W3/25 MCA55 erkennt das CD4 Oberflächenglycoprotein, ein 55kD großes Molekül, exprimiert von T-Helferzellen, Thymocyten und Makrophagen. 1:500	
	Klon-Nr: MRC OX-8 MCA48 erkennt das CD8 Zelloberflächenantigen, exprimiert von T-Lymphocyten, den meisten Thymocyten und den meisten NK-Zellen. 1:500	

Tabelle 4: Verwendete 1. Antikörper

Antigen-lokalisation	Kurze Beschreibung (alle von Serotec) und verwendete Arbeits-Verdünnung	Nachweis
	Klon-Nr: R73 MCA453 erkennt eine konstante Determinante der β -Kette des $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptors (TCR), der von 97% der peripheren T-Zellen exprimiert wird und als OX-52-Marker definiert ist. 94% der CD4 Zellen sind positiv. 1:500	
	Klon-Nr: OX-62 MCA 1029 erkennt ein Antigen, E2 integrin, welches von einigen Dendritischen Zellen und von γ/δ T-Zellen exprimiert wird. 1:50	
	Klon-Nr: NDS61 MCA494G erkennt die α -Kette des IL-2-Rezeptors bei Ratten (CD25), ein 55kD großes Molekül, . 1:500	
	Klon-Nr: MRC OX-6 MCA46R erkennt eine Determinante des Ratten I-A antigens des MHCII Komplexes auf B-Lymphocyten, Dendritischen Zellen, einigen Makrophagen und speziellen Epithelzellen. 1:800	
	Klon-Nr: ED5 Der ED5 AK erkennt follikuläre Dendritische Zellen in B-Zellfollikeln und Mesangiumzellen der Niere.	konnte nicht nachgewiesen werden
	Klon-Nr: Ab-3 Ki67 ist ein nukleäres Protein, welches von proliferierenden Zellen exprimiert wird. Bezugsquelle: Biocarta 1:800	
	Klon-Nr: MRX OX 33 Dieser Antikörper erkennt die höher molekulare Bande des „leukocyte common antigens“ (LCA) definiert als CD45RA . Er soll nur B-Zellen und keine Thymocyten markieren.	erwies sich nicht als spezifisch für B-Zellen im Hoden

2.2.3 Quantifizierung der Immunzellpopulationen im Hoden

Die Quantifizierung und die statistische Auswertung erfolgte mit freundlicher Hilfe von Dr. Mark Hedger im Institute of Reproduction and Development in Clayton/Melbourne, Australien. Immunhistochemisch gefärbte Zellpopulationen wurden mit Hilfe des C.A.S.T.-Grid Programms auf einem Computer mit Videoadapter und einem Durchlichtmikroskop mit 40er Objektiv (Olympus BH-2) quantifiziert, wobei die Endvergrößerung 1090fach war. Dazu wurden die einzelnen Gewebeschnitte vermessen und ein elektronisch generierter Rahmen über das mikroskopische Bild gelegt. Mit Hilfe eines motorisierten Objektisches (Lang GmbH, Hüttenberg, Deutschland) wurden von dem Programm zufällig ausgewählte Fenster von ca. $57.000\mu\text{m}^2$ Größe ausgewählt und angesteuert. Diese Fenster wurden bezüglich der relevanten Zellpopulation ausgezählt, wobei nur positive Zellen quantifiziert wurden, deren Kern sichtbar war. Die Zellen die auf den Begrenzungslinien lagen wurden nicht mitgezählt. Quantifiziert wurden zwischen 76 und 266 Fenster pro Schnitt, je nach Zellpopulation. Außerdem wurden pro Zellpopulation und Behandlungsgruppe die durchschnittlichen Zelldurchmesser der zu quantifizierenden Zellen nach dem Schema in Wang et al. 1994 ermittelt. Die Zelldichten im Hoden der quantifizierten Zellen wurden mit Hilfe der erhaltenen Zellzahlen und Durchmesser mittels Exceltabelle und

der Formel: $N_{v,i,t} = N_{A,i,t} / D + t$

wobei $N_{A,i,t}$ = Zellkerndichte auf dem Schnitt
 D = mittlerer Zellkerndurchmesser
 t = Schnittdicke

ermittelt (Wang et al., 1994).

Wobei die absolute Zellzahl im Hoden mit $N_{i,t} = N_{v,i,t} \times V_t$ berechnet wird, V_t = Hodenvolumen. Das Hodenvolumen wurde nach Entnahme durch Wiegen und Berechnung ermittelt.

2.2.4 cDNA-Atlas-Array-Methode

Diese Methode erlaubt es, differentiell exprimierte Gene nachzuweisen. Diese von u.a. der Firma Clontech (Palo Alto, CA, USA) angebotenen Test-Kits bestehen aus Nylonmembranen mit hunderten aufgetragener cDNA-Spots. Der in diesem Projekt verwendete cDNA Atlas Rat 1.2 Array kann 1200 verschiedene Gene nachweisen. Total RNA aus den zu untersuchenden Geweben oder Zellen wird mit den mitgelieferten genspezifischen Primern revers transkribiert und gleichzeitig markiert. Durch die spezifisch transkribierten cDNA- Proben wird zum einen die Spezifität verbessert und zum anderen der Hintergrund verringert. Das zur Markierung verwendete Isotop war $\alpha^{32}\text{P}$ -dATP. Die Detektion erfolgte mit einem Phosphoimager (Fuji FLA-30006 Imaging System).

2.2.4.1 RNA-Aufbereitung aus Hodengewebe für den Atlas Array

Phenol/Chloroform-Extraktion nach Angaben der Firma Clontech:

Die benötigte RNA wurde zunächst mit dem von der Firma Clontech vorgeschlagenen AtlasTM Pure Total RNA Labeling System gewonnen. Dieses Verfahren beinhaltet eine Lyse des bereits pulverisierten Gewebes unter denaturierenden Bedingungen. Die eigentliche Extraktion der RNA erfolgt mittels Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol, wobei hier ein speziell gesättigtes Phenol eingesetzt wurde. Die weitere Aufreinigung erfolgte mit Isopropanol und Ethanol.

Gesättigtes Phenol:

100 g Phenol in einem geschlossenen Gefäß unter einem Abzug auf 70°C erhitzen, bis es vollständig gelöst ist. 95 ml des gelösten Phenols werden zu dem mitgelieferten „Saturation-Buffer“ gegeben und gut gemischt. Das gesättigte Phenol wurde aliquotiert und bei -20°C gelagert. Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1) wurden im angegebenen Verhältnis gemischt mit 0,1 M Natriumcitrat auf pH 4,5 eingestellt und mit EDTA (1 mM) versetzt.

Säulen-Aufreinigung:

Auf Grund der schlechten Ausbeuten und der starken Verunreinigungen wurden, entgegen den Empfehlungen der Firma Clontech, die für den Atlas cDNA-Array verwendeten Proben mittels RNeasy Mini Kit (QIAGEN, Hilden) gewonnen. Auch bei diesem Verfahren wird das Gewebe zunächst tiefgefroren pulverisiert und in Lysispuffer (Guanidinisothiocyanate) überführt. Die RNA-Aufreinigung erfolgt auf Grund der selektiven Bindung der RNA an eine auf Silicagel basierenden Matrix. Ein Hochsalz-Puffergemisch in Verbindung mit Ethanol sichert die optimalen Bindungsbedingungen für die RNA. Das Säulensystem erlaubt eine schnelle und effiziente Auswaschung der kontaminierenden Bestandteile. Die Elution der RNA erfolgt mit sterilem A. dest. Die genauen Versuchsbeschreibungen und Pufferzusammensetzungen sind in den jeweiligen Handbüchern der Firmen zu finden.

2.2.4.2 Spektrometrische Quantifizierung von Nucleinsäuren

Die spektrometrische Quantifizierung ist möglich, da die zu untersuchenden Stoffe eine bestimmte optische Dichte haben. Die gemessene Absorption gibt Aufschluß über Quantität und Qualität des zu untersuchenden Stoffes.

Ihr Spektralcharakteristikum erhalten die Nucleinsäuren aus den einzelnen Basen die sie beinhalten, von 250 und 270 nm und ergeben für deren Gemische ein Absorptionsmaximum bei 260 nm. Bei dieser Wellenlänge gemessene Nucleinsäurelösungen entsprechen, bei einer Schichtdicke von 1 cm (Küvettenstärke) und einer gemessenen Absorption von 1, folgenden Konzentrationen:

Doppelsträngige DNA	50 µg/ml
RNA	37 µg/ml
einzelsträngige DNA	37 µg/ml
kurzkettige Oligonucleotide	20 µg/ml

Man bezeichnet diese Mengen auch als A_{260} -Einheit. Eine weitere Größe ist der Absorptionskoeffizient, der als Quotient aus der Messung bei 260 nm und 280 nm bestimmt wird. Dieser auch als $A_{260/280}$ Ratio bezeichnete Wert gibt an, wie rein die Nucleinsäurepräparation ist. Verunreinigungen mit Proteinen deren Absorptionsmaxima bei 280 nm liegt, können so nachgewiesen werden. Bei sehr reinen RNA-Lösungen liegt dieser Wert zwischen 1,9 und 2,0. Niedrigere Werte weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen oder Phenol hin.

2.2.4.3 DNase I Behandlung der Total RNA

Diese Behandlung wurde in Anlehnung an das Protokoll der Firma Clontech „*DNase Treatment of Total RNA*“ durchgeführt. Um die genomische DNA aus der RNA-Präparation zu eliminieren, wurden die Proben einer DNase I Behandlung unterzogen. Dies ist wichtig, da sonst im folgenden Versuch nicht nur die revers transkribierte cDNA, sondern auch die genomische DNA an die entsprechenden Genspots binden würden. Dies würde zu falsch negativen oder herabregulierten Ergebnissen führen, da nur die radioaktiv markierte cDNA detektiert werden kann, die jedoch mit der nicht markierten genomischen DNA um die Bindungsstellen kompetitiert.

Verwendete Puffer:

10 x DNase I Puffer:

400 mM Tris-HCl (pH 7,5)
100 mM NaCl
60 mM MgCl ₂

10 x Terminationsmix:

0,1 M EDTA (pH8,0)
1 mg/ml Glycogen

Ein Einzelansatz sah wie folgt aus:

250 µl Total RNA (1µg/µl)
 100 µl 10 x DNase I Puffer
 25 µl DNase I (1u/ml)
 175 µl steriles A.dest

Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert und der enzymatische Abbau der genomischen DNA wurde mit 50 µl 10 x Terminationsmix gestoppt. Die Proben wurden durch vorsichtiges Pipettieren gemischt. Zur Aufreinigung wurden 250 µl gesättigtes Phenol und 175 µl Chloroform dazugegeben und gevortext. Die Phasentrennung erfolgte bei einer Zentrifugation von 14000 rpm (Biofuge) für 10 min und 4°C. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, erneut mit 275 µl Chlorophorm versetzt und wie zuvor zentrifugiert. Wiederum die obere wässrige Phase wurde mit einem 1/10 Volumen (30 µl) 2MNaOAc und einem 2,5fachen Volumen (1,9 ml) 95%igem Ethanol versetzt und gemischt. Die Fällung der RNA erfolgte auf Eis für 15 min und durch anschließende Zentrifugation bei 14000rpm für 15 min und 4°C. Das Pellet (RNA) wurde erneut mit 80%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 100µl RNase freiem Wasser aufgenommen.

2.2.4.4 Herstellung und Aufreinigen der radioaktiv markierten cDNA-Sonden

Benötigte Puffer und Reagenzien:

$\alpha^{32}\text{P}$ -dATP ohne Farbzusatz (Amersham, Braunschweig)

Folgende Puffer und Lösungen sind im Kit (Clontech) enthalten:

5 x Reaktionspuffer:

250 mM Tris-HCl (pH8,3)
 375 mM KCl
 15 mM MgCl_2

10 x dNTP-Mix:

je 5 mM dCTP, dGTP und dTTP

10 x CDS-Primer-Mix:

enthält alle 1200 Primerpaare der nachzuweisenden Testgene

DTT-Lösung 100 mM

10 x Terminationsmix:

0,1 M EDTA (pH8,0)
 1 mg/ml Glycogen

MMLV-Reverse Transkriptase

Kontroll-Poly A⁺RNA 0,5µg/µl

C₀t-1 DNA 1 mg/ml

Deionisiertes und steriles Wasser

Die Herstellung der Sonden erfolgte wegen der geringen RNA-Konzentration der Proben in einem 20µl Ansatz, in dem etwa 3µg Hoden Gesamt-RNA in dem maximal zur Verfügung stehenden Volumen von 4µl eingesetzt wurden. Von der Poly-A-Kontrolle wurden 2 µl eingesetzt und mit 2 µl Wasser aufgefüllt, um auf das gleiche Volumen zu kommen.

Zunächst wurde ein Mastermix für die Reaktionsansätze hergestellt.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Mastermixes

Bestandteil	Einzelansatz	Gesamtansatz
5 x Reaktionspuffer	4 µl	20 µl
10 x dNTP Mix	2 µl	10 µl
α^{32} -P-dATP	5 µl	25 µl
DTT	1 µl	5 µl
Gesamtmenge	12 µl	60 µl

Die Proben von je 4 µl wurden in 0,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäße vorgelegt und jeweils 1 µl des 10 x CDS Primer Mixes dazu pipettiert, gut gemischt und anzentrifugiert. Die Proben wurden für 2 min bei 70°C denaturiert und anschließend für 2 min bei 50°C equilibriert. Während dieser Zeit wurde für jede Probe 1 µl MMLV-Reverse Transkriptase in den Master Mix gegeben, und nach Ablauf der Inkubationszeit jeweils 13 µl des Master Mixes zu den Proben pipettiert. Die reverse Transkription der RNA mit den entsprechenden Primern zur radioaktiv markierten cDNA erfolgte während einer Inkubation von 25 min bei 50°C. Die Reaktion wurde mit je 2 µl 10 x Terminationsmix abgestoppt.

Die Aufreinigung der Proben erfolgte mittels Säulen-Chromatographie. Hierbei wurden u.a. die nichteingebauten dNTPs, einschließlich den radioaktiven, aus der Probe entfernt, was nicht nur zu einer geringeren Strahlenbelastung, sondern auch zu weniger Hintergrund bei der Detektion der differenziell exprimierten Gene führte. Die im Kit enthaltenen CHROMA SPIN-200 DEPC-H₂O Säulen wurden mindestens 1 h auf RT gebracht und dabei einige male über Kopf gekippt, um die Gelmatrix zu suspendieren. Zunächst wurde die Bodenkappe, erst dann der Deckel der Säule geöffnet und die Säule in ein 1,5 ml Eppendorf Reaktionsgefäß gestellt. Die Säule sollte nach dem Ablauf der Resuspensionsflüssigkeit ein waagerechtes Gelbett bei der 1 ml Marke aufweisen. Ansonsten kann man Matrixmaterial aus anderen Säulen zur Übersichtung verwenden.

Die zu reinigenden Proben wurden jeweils auf die Mitte des Gelbettes pipettiert. Anschließend wurden die Proben mit je 1 x 40 µl und 1 x 250 µl deionisiertem sterilem Wasser gewaschen und vollständig aus der Säule tropfen lassen. Es wurden 6 Fraktionen von je 100µl gesammelt. Um die Fraktionen der markierten Proben zu finden, wurden je 2 µl einer Fraktion mit 5 ml Szintilationsgemisch versetzt und im Szintilationscounter (Easy Count) gemessen. Zu beachten ist hierbei, daß dieser Modus eine geringere Sensitivität für die ³²P-Strahlung aufweist, somit weniger Zerfälle registriert und fälschlich niedrigere Einbauraten errechnet werden. Für die Bestimmung der Einbaurate und den Einsatz der Proben zur Hybridisierung sollte dies berücksichtigt werden. Als Standard wurden 2 µl des Master Mixes mit 5 ml Szintilationsfluid gemischt und in dem Easy Count Modus gemessen.

Die Fraktionen mit der höchsten Aktivität (die Fraktionen 2 und 3) wurden gesammelt und gepoolt. Diese Probe sollte als Richtwert eine Aktivität von etwa 5-20 x 10⁶ cpm aufweisen (Positiv kontrolle mit der Poly A-Kontrolle 2-10 x 10⁶ cpm).

2.2.4.5 Hybridisierung

Benötigte Lösungen und Reagenzien:

Sheared salmon testes DNA (10 mg/ml)

10 x Denaturierungslösung:

1 mM NaOH

1 mM EDTA

2 x Neutralisierungspuffer:

1 mM NaH₂PO₄

ad pH 7,0 mit 10 N NaOH

20 x SSC:

175,3 g NaCl

88,2 g Na₃Citrate-2H₂O

ad 1 l

ad pH 7,0 mit 1 M HCl

20% SDS:

200 g SDS

ad 1l lösen bei 65°C

Waschlösung 1:

2 x SSC

1% SDS

Waschlösung 2:

0,1 x SSC

0,5 x SDS

Waschlösung 3:

2 x SSC

Zunächst wurde die Prähybridisierungslösung vorbereitet. Pro Ansatz wurden 5 ml Express Hybridization Solution (im Kit) mit jeweils 0,5 g gescherter Lachshoden DNA (10mg/ml) gemischt, auf 90°C für 5 min erhitzt und sofort bis zum weiteren Gebrauch auf Eis gestellt.

Danach wurden die Atlas cDNA Expressions Array Membranen (im Kit), für die Hybridisierung vorbereitet. Dazu wurden diese in 200 ml 0,5% SDS 80-90°C für 2 min eingeweicht. Anschließend wurden die Membranen in die Hybridisierungsflaschen mit den cDNA Beschichtungen nach innen eingebracht, mit sterilem deionisiertem Wasser gespült und mit je 5 ml Prähybridisierungslösung überschichtet. Die Prähybridisierung erfolgte 30 min bei 68°C und 5-7 rpm.

Während dieser Zeit wurden die Proben für die Hybridisierung vorbereitet.

200 µl Probe (Pool aus zwei Fraktionen) wurden mit 22 µl 10 x Denaturierungspuffer für 20 min bei 68°C inkubiert. Anschließend wurden 5 µl C₀t-1 DNA und 225 µl 2 x Neutralisierungspuffer dazugegeben und für weitere 10 min bei 68°C inkubiert.

Diese Proben wurden in den Prähybridisierungs-Mix gegeben und mit 5-7 rpm bei 68°C ü.N. hybridisiert.

Am nächsten Tag wurden die Waschlösungen auf 68°C vorgewärmt. Pro Waschschrift wurden 200 ml Lösung verwendet und die Rotation der Röhren auf 12-15 rpm erhöht. Gewaschen wurde 4 x mit Waschlösung 1 für 30 min bei 68°C, 1 x mit Waschlösung 2 für 30 min bei 68°C und 1 x mit Waschlösung 3 für 5 min bei RT.

Anschließend wurden die Membranen in Folie eingepackt und in Filmkassetten eingelegt.

Die Membranen können mittels kochendem 0,5%igem SDS innerhalb von 20 min regeneriert werden. Die Membranen sind bei -20°C zu lagern und vor Austrocknung zu bewahren.

2.2.4.6 Detektion und densitometrische Auswertung

Die Detektion erfolgte zum einen per Phosphoimager (Fuji FLA-30006 Image System). Anschließend wurde noch ein Kodak BioMax Film MS mit Intensivierungsfolie aufgelegt.

Die densitometrische Auswertung der Phosphoimagedaten wurde mit Hilfe des Macintoshprogramms Image Gauge von Anja Wahle geb. Lewen und Jonas Wahle durchgeführt. Hierbei diente die GAPDH-Kontrolle zur Normalisierung der Daten.

2.2.5 Western-Blot-Analyse

2.2.5.1 Herstellung von Hodenhomogenat

Die Herstellung des Hodenhomogenates erfolgte wie unter Punkt 2.2.1.2 beschrieben. Die Lösung wurde jedoch stärker verdünnt.

2.2.5.2 Proteinbestimmung nach Bradford

Zur Quantifizierung der Proteinmenge in der Hodenhomogenatlösung wurde die Bradford-Methode gewählt. Als Detektionssubstrat wird hierbei Coomassie-Brillantblau G250 verwendet. Dieser Farbstoff bildet mit den Arginin-Resten der Proteine Komplexe, die ein Absorptionsmaximum von 595nm aufweisen. Bei dieser Wellenlänge wurde die spektrophotometrische Quantifizierung durchgeführt. Da der ungebundene Farbstoff ein Absorptionsmaximum von 465nm aufweist, stört dieser den Nachweis bei 595nm nicht. Dieses Verfahren eignet sich am besten, um Proteinmengen im Bereich von 1-10 µg zu bestimmen. Zur Durchführung der Messung wurde das Hodenhomogenat 1:500 mit PBS verdünnt. 20 µl dieser Lösung wurden mit 1ml der Bradfordreagenzlösung (Biorad) gemischt und nach 10 min Inkubation bei RT bei 595 nm gemessen. Als Leerwert wurden 20 µl PBS mit 1ml Reagenzlösung gemischt. Auf Grund der Inhomogenität des Hodenhomogenates wurden Dreifachbestimmungen gemacht. Die Proteinkonzentrationen konnten anhand einer Standardkurve (Ovalbumin/Serva) ermittelt werden. Anschließend wurde das Hodenhomogenat aliquotiert und bei -20° eingefroren.

2.2.5.3 1-Dimensionale-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

(Laemmli, 1970)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) können Proteine getrennt werden, rein nach ihren Größen, ohne Berücksichtigung ihrer Ladungen im nativen Zustand oder ihrer Konformationen. Natriumdodecylsulfat (SDS) wird im Überschuß zugegeben und lagert sich in konstantem Verhältnis an die Proteine. Die dadurch in ihrer komplexierten Form negativ geladenen Proteine können nun nur noch in Richtung Anode wandern. Die gleichzeitige völlige Denaturierung führt dazu, daß die Proteine in Gelen mit entsprechendem Vernetzungsgrad rein nach ihrer Molmasse getrennt werden. Die Polymerisation erfolgt durch eine Radikalkettenreaktion, die mit dem Zerfall von Peroxydsulfationen (APS) in Radikale gestartet wird, welche daraufhin Tetramethylethyldiamin (TEMED) aktivieren. In dieser Doktorarbeit wurde das System nach Laemmli verwendet, in dem die Proteine zunächst in einem Sammelgel konzentriert wurden, um dann in einem anschließenden Trenngel nach ihren Molmassen getrennt zu werden.

Die Herstellung der einzelnen Gellösungen erfolgte nach den üblichen Literaturrezepten (Sambrook et al, 1989; Tabelle 6:).

Tabelle 6: Zusammensetzung der Gellösungen

	Sammelgel 4%ig; 1mm	Trenngel 13%ig; 1mm
30% Rotiphorese Gel 30 (PAA) (Roth, Karlsruhe)	0,65 ml	4,35 ml
1,5 M Tris - HCl, pH8,8		2,5 ml
0,5 M Tris - HCl, pH6,8	1,25 ml	
10% (w/v) SDS	50 µl	100 µl
dH ₂ O	3 ml	3 ml
TEMED	5 µl	5 µl
10% (w/v) APS	25 µl	50 µl

Weitere Lösungen:

Probenpuffer nach Laemmli:

160 mM Tris - HCl pH 6,8
140 mM SDS
20% (v/v) Glycerin
1 Spatelspitze Bromphenolblau
40 mg/ml Dithioerythritol (DTT)

1 x Elektrophoresepuffer:

25 mM Tris - Base
190 mM Glycin
0,1% (w/v) Natriumdodecylsulfat (SDS)

Die Gelmengen sind exakt ausreichend für zwei Minigele, die in den Gießständen der Firma Keutz gegossen wurden. Während der Polymerisation wurden die Trenngele mit Isopropanol überschichtet, um eine feine und gerade Einlauffront für die Proteine zu gewährleisten. Nach der Polymerisation wurde der Alkohol mit einer Spritze abgenommen und mit A. dest. gut nachgespült. Nach dem Gießen des Sammelgels wurden sofort die entsprechenden Kämme aufgesteckt und bis zur Verwendung der Gele dort belassen.

Die Proben wurden vor dem Gelauftrag 2+1 mit Probenpuffer gemischt und 5 min bei 95°C aufgeköcht. Die Proteintrennung erfolgte in 1 x Elektrophoresepuffer bei 200 V für 45 min.

2.2.5.4 2-Dimensionale-SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Bei der 2D - Elektrophorese werden die Proteine in zwei Richtungen nach unterschiedlichen Kriterien aufgetrennt. In der ersten Dimension erfolgt die Trennung mittels isoelektrischer Fokussierung in einem PAA - Harnstoffgel (O'Farrell). Die zweite Dimension dann nach dem Molekulargewicht in einem nicht reduzierenden PAA-Gel. Dieses Verfahren erlaubt es komplexe Proteingemische wesentlich besser in ihre Einzelfractionen aufzutrennen, als das in einem ein-dimensionalen System möglich ist.

Isoelektrische Fokussierung - 1. Dimension:

Benötigte Lösungen:

- | | |
|--------------------------------------|--|
| (1) <i>Sealer</i> - Stammlösung: | 30 ml 30% PAA
100 µl TEMED
ad 100 ml dH ₂ O |
| (2) <i>Sealer</i> - Gebrauchslösung: | 10 ml Stammlösung
40 µl TEMED
100 µl 10% (w/v) APS |
| (3) Gellösung: | 9,98 g Harnstoff
3,3 ml 30% PAA
200 µl 10% (v/v) TX-100
ad 18 ml H ₂ O
im 37°C Wasserbad lösen
50 µl Trasylol
20 µl 10 mM Foy - 305
20 µl 100 mM PMSF |
| Trägerampholyte: (Serva) | |
| Oligoamino - oligocharbonsäuren | 200 µl pH 9,0-11,0
200 µl pH 5,0 - 8,0
200 µl pH 4,0 - 6,0
500 µl pH 3,5 - 10,0
ad 20 ml dH ₂ O
entgasen, auf Eis abkühlen
20µl TEMED
50µl 10% (w/v) APS |
| (4) <i>Soaking</i> - Puffer: | 68,5 mM Tris - HCl pH 6,8
5% (w/v) SDS
5% (v/v) Glycerol
Bromphenolblau |

Für ein ca. 12 cm x 11cm großes Gel wurden eine Glasplatte und eine Plexiglasplatte, mit den Taschenwülsten nach innen, durch 1mm dicke Spacer getrennt, mit Klammern aufeinander fixiert; alle Utensilien sind absolut fettfrei. Die Spacerzwischenräume wurden mit der *Sealer* - Gebrauchslösung abgedichtet und nach deren Polymerisation die Gellösung eingefüllt. Das auspolymerisierte Gel wurde auf der Glasplatte liegend durch Kapillarkräfte auf dem vorgekühlten (12°C) Auflagepodest der Flachbett-Elektrophoresekammer fixiert und wie folgt für die Elektrofokussierung vorbereitet. Filterpapiere wurden auf beiden Gelenden etwa 3 - 4 mm überlappend aufgelegt, auf der Anodenseite mit 1 M Propionsäure getränkt, auf der Kathodenseite mit 2 N NaOH getränkt. Die Vorfokussierung zur Ausbildung des pH - Gradienten erfolgte für 30 min bei 2,5 mA. Während dieser Zeit wurden die Proben für den Auftrag vorbereitet, in dem sie mit der Gellösung (3), ohne TEMED und APS, auf 80 µl eingestellt wurden. Anschließend wurden diese blasenfrei in die Auftragstaschen pipettiert und wie folgt isoelektrisch fokussiert: je 1 h bei 2,5 mA, 5 mA und 7,5 mA, danach wurde die Stromstärke auf 10 mA eingestellt und solange weitergeführt, bis die Stromstärke auf 3,0 mA abgefallen war. Das Ende der 1. Dimension bildete der Abbau des Gels und dessen Zerschneidung in 6 Längsstreifen entlang der Laufrichtung der Proben. Die 5 probenenthaltenden Streifen wurden für 20 min in den *Soaking* - Puffer überführt, um sie dann in die 2. Dimension zu überführen (siehe PAA-Gel-2.Dimension). Der 6. Gelstreifen enthielt ein spezielles Proteingemisch, 50 µg Zymogengranulainhalt (3,5 µg/µl)

plus 1 µl (10 µg) Cytochrom C (zur Verfügung gestellt von Frau Dr. Katja Schmidt) und diente als Marker zur visuellen Kontrolle während des Gelllaufes. Zur pH-Wert-Analyse des sich entwickelten Gradienten wurde dieser Streifen in 0,5 mm breite Stücke geschnitten und in 2 ml H₂O überführt. Nach einer mindestens 30 minütigen Inkubation wurden die pH-Werte der einzelnen Fraktionen ermittelt.

PAA - Gel - 2.Dimension:

Für jede Probe, bzw. jeden Gelstreifen aus der 1. Dimension, wurde ein PAA-Gel gegossen. Damit der Probenaufrag, d.h. hier die Aufnahme der Gelstreifen möglich war, wurden Gele mit einer entsprechenden Taschengröße und einer Dicke von 1,5 mm gegossen. Auch hierbei wurden die Spacerzwischenräume mit Sealer-Gebrauchslösung (2) abgedichtet, bevor das eigentliche Gel gegossen wurde. Nach der Polymerisation von Trenn- und Sammel-Gel (nach der Rezeptur in Tabelle 7:) wurden die Gelstreifen der 1. Dimension in die präparativen Taschen überführt und die Auftrennung der Proben, bei RT mit 10 mA in 1 x SDS - Laufpuffer ü.N. (siehe 2.2.5.3) gestartet.

Tabelle 7: Gellösungen für die 2. Dimension 1 Gel

	Sammelgel 5%ig; 1,5mm	Trenngel 12,5%ig; 1,5mm
30% Rotiphorese Gel 30 (PAA) (Roth, Karlsruhe)	2,49 ml	13,34 ml
2 M Tris - HCl, pH8,8		5,96 ml
2 M Tris - HCl, pH6,8	1,875 ml	
20% (w/v) SDS	75 µl	160 µl
dH ₂ O	10,28 ml	12,42 ml
TEMED	15 µl	16 µl
10% (w/v) APS	120 µl	96 µl
Volumen	15ml	32 ml

2.2.5.5 Fixierung, Färbung und Entfärbung der Gele

a) Coomassie-Färbung:

Coomassie-Brilliant Blau R-250 oder G-250 wird zur Proteinfärbung in Polyacrylamid-Gele verwendet. Hierbei erfolgt zunächst eine Überfärbung, dann eine Entfärbung der Gele, bis zur gewünschten Farbintensität. Mit dieser Methode lassen sich noch 0,2 bis 0,5 µg Protein pro Bande nachweisen.

Die benötigten Lösungen setzten sich wie folgt zusammen:

Farblösungen:

50% (v/v) Methanol
10% (v/v) Essigsäure
0,125% (w/v) Coomassie Blau R-250

Entfärbelösung:

50% (v/v) Methanol
10% (v/v) Eisessig

Zur Proteinfärbung wurden die Gele in die Färbelösung gebracht und unter leichtem Schütteln für etwa 45 min bei RT gefärbt. Das anschließende Entfärben erfolgte unter gleichen Bedingun-

gen in der Entfärbelösung bis zur gewünschten Farbintensität der Proteinbanden, evtl. mit mehrmaligem Wechseln der Entfärbelösung.

b) Silberfärbung:

(Hempelman und Kaminsky, 1986)

Die Silberfärbung ist eine hochempfindliche Methode Proteine in Polyacrylamid-Gelen nachzuweisen und 10 bis 50 mal empfindlicher als die Coomassiefärbung. Dieses Nachweisverfahren kann man mit dem photographischen Prozeß in lichtempfindlichen Silberhalogen-Schichten vergleichen. Bei pH-Werten von über 10,5 werden die Silberionen an die Proteinstrukturen durch Komplexbildung gebunden und nicht komplexierte Ionen werden während den Waschvorgängen wieder aus dem Gel gelöst. Die eigentliche Schwarzfärbung entsteht durch die Ausbildung sogenannter Silberkeime, die durch Reduktion der Silberionen an den Makromolekülen hervorgerufen wird. Unter geeigneten Bedingungen können so Proteinmengen von 0,05 bis 50 ng in einem Gel nachgewiesen werden.

Für diesen Nachweis werden folgende Lösungen benötigt:

1) Fixierlösung:

300 ml Isopropanol
34,5 g Sulfosalicylsäure
11% (v/v) TCA
ad 1 l dH₂O

2) Fixier- und Reaktionslösung:

20% (v/v) Ethanol
5% (v/v) Essigsäure
0,002% (w/v) DTT

3) Oxidationslösung:

0,5% (w/v) Kaliumdichromat

4) Färbelösung:

0,1% (w/v) AgNO₃

5) Entwicklerlösung:

3% (w/v) Na₂CO₃
0,2% (w/v) Paraformaldehyd

Für ein gutes Färbeergebnis wurden alle Lösungen frisch angesetzt. Nach dem Abbau der Gelaufapparaturen wurden die Gele unverzüglich in die Lösung 1) überführt und für 3 Tage fixiert. Die Lösung wurde alle 24h gewechselt. Anschließend wurden die Gele 2 mal 20 min in die Lösung 2) gebracht, um die Farbreaktion vorzubereiten. Oxydiert wurden die Gele dann für 15 min in der dafür vorgesehenen Lösung 3) und anschließend unter mehrfachem Wechseln des destillierten Wassers gespült, bis die Gele wieder vollkommen klar waren. Die Färbung erfolgte für etwa 20 min in der Lösung 4), wobei eine sichtbare Farbreaktion erst nach der Inkubation in der Lösung 5) für etwa 10 min erschien. Entwickelt wurde unter Sichtkontrolle bis zur gewünschten Farbintensität und diese Reaktion mit 1% (v/v) Essigsäure gestoppt. Die Gele wurden zur Datensicherung eingescannt und digital gesichert.

2.2.5.6 Westernblot-Analyse

(Towbin et al., 1979)

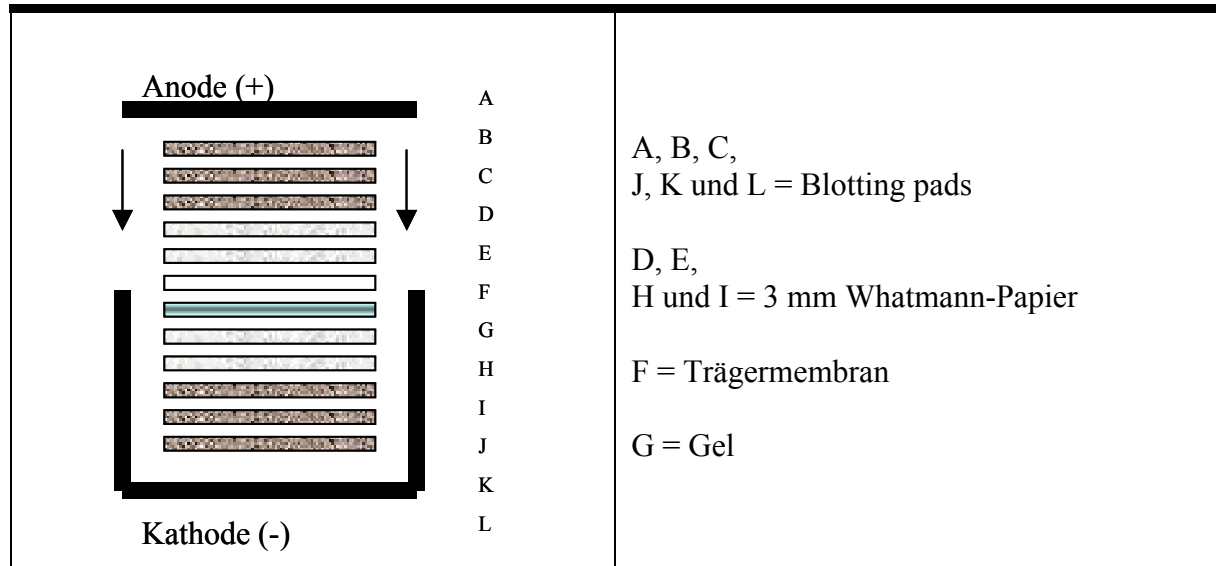
Mittels Westernblot-Analyse lassen sich die zuvor in einem entsprechenden Gel aufgetrennten Proteine auf einem geeigneten Träger, z.B. PVDF- (Polyvinylidendifluorid), Nitrocellulose- oder Nylonmembranen, für weitere Untersuchungen immobilisieren. Dazu werden die Proteine mit Hilfe eines elektrischen Feldes, welches senkrecht zur Laufrichtung des Gels verläuft, aus dem Gel auf die Trägermembran gebracht. Dadurch entsteht eine exakte Replik des Gels auf der Membran. Unter geeigneten Bedingungen bleibt die Immunreaktivität erhalten.

a) Blotverfahren für 1-D-SDS-Minigele

Die mittels der 1-D-SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit der Novex-Blotapparatur vertikal stehend in einem kontinuierlichen Puffersystem auf die Trägermembran transferiert. Nach dem Gellauf wurden das Gel und die Filterpapiere, Membranen und Blotting Pads in dem Blottingpuffer (siehe 2.1.5) vorinkubiert.

Der Blotaufbau erfolgte luftblasenfrei wie in Abbildung 5: gezeigt.

Abbildung 5: Blotaufbau der 1-D-SDS-Gele



Der Transfer der Proteine erfolgte bei 30 V für 1h bei RT, wobei die gesamte Apparatur mit Wasser gekühlt wurde.

Nach dem Blot wurden die Trägermembranen mit Ponceau S (siehe 2.1.5.1) gefärbt, um die Transfereffizienz zu begutachten und die geeigneten Bereiche der Membran für den nachfolgenden Nachweis in Streifen zu schneiden. Diese wurden in spezielle Plexiglasinkubationskammern (Medizinische Werkstatt, Marburg) eingebracht und für mindestens 1h bei RT in Absättigungspuffer (siehe 2.1.5) inkubiert, um die freien Bindungsstellen der Membran zu maskieren. Dies verhindert unspezifische Bindungen der im weiteren Versuchsverlauf eingesetzten Antikörper bzw. -seren.

b) Blotverfahren für 2-D-SDS-PAGE

Dieser Transfer im Semidry-Blottingverfahren erfolgte für die Nitrocellulosemembranen horizontal in einer Trans-Blot SD Apparatur der Firma BIORAD in einem kontinuierlichen Puffersystem. Alle auf die Gelgröße angepaßten Komponenten wurden gut mit Blottingpuffer (siehe 2.1.5) getränkt auf die Anodenplattform luftblasenfrei in folgender Reihenfolge gebracht: 3mm Whatmann-Filterpapier 3x, Nitrocellulosemembran (Porengröße 0,45µm) 1x, SDS-2D-Gel 1x, 3mm Whatmann-Filterpapier 3x. Der Aufbau wurde durch das Anpressen der Kathodenplatte gehalten. Der Blot erfolgte 3h bei 1mA/cm². Anschließend wurden die Membranen ü.N. bei 4°C in Absättigungspuffer (siehe 2.1.5) inkubiert.

Der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran erfolgte wie bereits für die Nitrocellulosemembranen beschrieben. Unterschied hierbei ist jedoch die Vorbereitung der Membran. Diese wurde nach dem Zuschneiden zunächst 20-30 sec in Methanol und anschließend 30 sec in A.dest. gewaschen, bevor sie in den Blottingpuffer (siehe 2.1.5) überführt wurde.

2.2.5.7 Visualisierung der Blotreaktionen

a) Immunologischer Nachweis spezifischer Antigene/Proteine

(Harlow and Lane, 1988)

Die Membranen der eindimensionalen Minigele wurden nach der Inkubation in Absättigungspuffer zum indirekten Nachweis und Screening von möglicherweise antigen wirkenden Proteinen des Gesamthodenhomogenates herangezogen. Dazu wurden die Seren der Versuchstiere 1:500 in Absättigungspuffer verdünnt, die Membranen damit überschichtet und bei 4°C ü.N. inkubiert. Anschließend wurden die Membranen 3 x 5 min in Waschpuffer (siehe 2.1.5) gewaschen und für 1h bei RT mit dem 2. AK (Ziege - anti - Ratte - IgG/IgM biotiniliert, 1:400 in Absättigungspuffer) inkubiert. Danach wurden die Membranen wie oben beschrieben gewaschen und 1h mit POD konjugiertem Streptavidin (1:5000 in Absättigungspuffer) inkubiert, ein weiteres mal gewaschen und für 5 min mit den gemischten Bestandteilen des Super Signal Kits (Pierce) im Dunkeln bei RT inkubiert, abgekippt und in für den Lumineszenznachweis geeignete Folien eingebracht. Die eigentliche Visualisierung der Chemolumineszenz erfolgte mittels Röntgenfilm (Fuji Super RX 18 x 24 100 NF; Inkubation 1-10 sec. mit anschließender Entwicklung und Fixierung). Die Chemo- bzw. Biolumineszenz wurde gewählt, da diese Methode je nach System 10-100 mal sensitiver ist als der Nachweis über das POD/DAB - System. Zum anderen lassen sich die Röntgenfilme besser archivieren und digitalisieren, was zur Erleichterung der densitometrischen Auswertung beitrug.

Die 2D-Membranen die zum immunologischen Nachweis möglicher Antigene verwendet wurden, wurden wie oben beschrieben behandelt.

b) Coomassiefärbung der PVDF-Membran

Zur Visualisierung der Proteine auf der PVDF-Membran wurde eine modifizierte Coomassiefärbelösung angewandt.

Coomassie für PVDF-Membranen:

0,5 g Serva Blue R-250
200 ml Methanol
50 ml Essigsäure
250 ml H₂O

Entfärber für die PVDF-Membran:

200 ml Methanol
50 ml Essigsäure
250 ml H₂O

Die Membran wurde 45 min bei RT gefärbt und anschließend ü.N. bei RT, bis zur gewünschten Farbintensität entfärbt. Danach wurde die Membran getrocknet und gut verpackt. Nach dem Abgleich mit den durch die Chemolumineszenz gewonnenen Röntgenfilmen konnten die Proteinspots lokalisiert werden. Diese Spots wurden aus der Membran geschnitten, für 3 Tage in A. dest. gewässert und zum Sequenzieren verschickt (Labor Dr. Dietmar Lindner, Biochemisches Institut, Klinikum Gießen).

2.2.6 Methoden in der Zellkultur

2.2.6.1 Permanente Kultivierung der R2-Makrophagen

Die ursprünglich aus Oxford, UK, stammende Pleuramakrophagen-Zelllinie der Ratte R2 wurde freundlichst von Dr. Holger Garn (Immunologisches Institut, Marburg) zur Verfügung gestellt. Alle Arbeiten der Zellkulturmethoden wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Laminar-Arbeitsbanch (Heraeus) durchgeführt.

Die Zellen wurden in frischem Medium mit 1×10^5 Zellen/ml in eine unbeschichtete 6-Well-Platte (3046/Falcon) verbracht. Der Mediumwechsel erfolgte jeden zweiten Tag. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem offenen System in einem Hera-Zell-Brutschrank (Heraeus) bei 37°C , ca. 80% Luftfeuchte und 5% CO_2 . Das verwendete Medium setzte sich wie folgt zusammen:

RPMI-Medium		PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria
incl. L-Glutamin	2 mM	
incl. HEPES	5 mM	
+ Natriumpyruvat	2 mM	Seromed / Biochrome, Berlin
+ Nichtessentielle Aminosäuren	1%	Seromed / Biochrome, Berlin
Penicillin - Streptomycin	100 μg / ml	PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria
+FKS (fötales Kälberserum)	10%	PAA Laboratories GmbH, Linz, Austria

2.2.6.2 Subkultivierung der Kulturzellen

Um die Zellen für die Subkultivierung von den Plastikböden der Kulturplatten zu lösen, wurde zunächst das Medium abgenommen und die Zellen anschließend mit eiskaltem calcium- und magnesiumfreiem PBS überspült. Um den Ablösevorgang der Zellen noch zu unterstützen wurden die 6-Well-Platten für 10 min auf Eis gestellt und leicht geschüttelt. Die Zellen wurden mit dem PBS abgesaugt, in einem Falconröhrchen gesammelt und für 10 min bei 500 rpm zentrifugiert (Heraeus). Der Überstand wurde dekantiert und die Zellen mit Medium gewaschen und dann in 10 ml Medium aufgenommen.

2.2.6.3 Bestimmung der Zellzahlen

Zur Zellzahlbestimmung wurden 10 μl der Zellsuspension mit 90 μl Trypan Blue 0,4% (Gibco BRL, Berlin) gemischt und in einer Brücker-Kammer (25 Kleinstquatre / Doppelbestimmung) ausgezählt. Mit folgender Formel wurde die Zellzahl errechnet: Zellzahl pro ml = Zellzahl x Kamerverdünnungsfaktor (10^4) x Farbverdünnungsfaktor (10). Die Zellsuspension wurde auf 1×10^6 Zellen/ml mit Medium eingestellt und neu ausgesät.

2.2.6.4 Stimulation der Zellen mit LPS

Zur Stimulation der Zellen mit LPS (Sigma, Deisenhofen) wurden diese wie unter 2.2.6.2 und 2.2.6.3 beschrieben in Petrischalen (Durchschnitt 94 mm) zu 10 ml (1×10^6 Zellen/ml) ausgesät und ü.N. unter Standardbedingungen (siehe 2.2.6.1) gehalten. Pro Petrischale wurden 100 ng LPS (in H_2O gelöst / sterilfiltriert) zugesetzt und für weitere 6h inkubiert. Danach wurden die Zellen mit warmem Medium gewaschen und mit je 15 ml peqGOLD TriFastTM (PeqLab, Erlangen) pro Platte überschichtet, die Zellen mit einem Zellschaber von der Petrischale gelöst und in einem 15 ml Falconröhrchen bei -80°C ü.N. eingefroren.

2.2.6.5 RNA-Extraktion der stimulierten Zellen

Die unter 2.2.6.4 beschriebenen Falconröhrchen wurden aufgetaut und gut gemischt, auf Eppendorfreaktionsgefäße verteilt und nach dem PeqLab Spezialprotokoll-Pankreas aufgearbeitet, wobei hier der Schwerpunkt auf der RNA-Aufreinigung lag.

Zur Homogenisierung der Zellen in der einphasigen Phenol-Guanidinisothiocyanat-Lösung wurden Insulinspritzen mit dünnen Nadeln (24GA1 0,55 x 25 Nr.17) verwendet. Eine kurze Inkubation bei RT erlaubt die Dissoziation der Nukleotidkomplexe. Danach wurden die Proben mit Chloroform gemischt, kräftig geschüttelt und ein weiteres mal bei RT inkubiert. Nach der Zentrifugation (12000 g / 5 min) in der Biofuge trennt sich das Homogenat in drei Phasen. In der oberen wässrigen Phase befindet sich die RNA. Diese wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und mit kaltem Isopropanol wie folgt gefällt: Inkubation für 15 min bei RT und Zentrifugation mit 12000 g für 10 min. Das von gelartiger Konsistenz entstandene Präzipitat wurde vom Isopropanol befreit und in einer GTC-Lösung (siehe 2.1.5) resuspendiert und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt.

Durch Zugabe von Isopropanol wurde die RNA erneut gefällt (s.o.) und ein weiteres mal in GTC-Lösung aufgenommen und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und gefällt.

Dieses Pellet wurde danach zwei mal in 75%igem Ethanol gewaschen (Vortexen und Zentrifugieren bei 12000 g / 10 min / 4°C). Alle Proben wurden dann kurz luftgetrocknet und in RNase freiem H₂O aufgenommen, gepoolt und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.2.6.6 Einfrieren der Zellen

Zur Aufbewahrung der Zellen über längere Zeit werden diese in flüssigem Stickstoff gelagert. Dazu wurden die Zellen wie unter 2.2.6.2 und 2.2.6.3 beschrieben auf 5x10⁶ Zellen in kaltem FKS inklusive 10% DMSO eingestellt und in Spezial Einfrierröhrchen (Nunc, Wiesbaden) aliquotiert. Die Röhrchen wurden in Alufolie eingepackt und einen Tag bei -20°C eingefroren, danach einen Tag bei -80°C gelagert, bevor sie dann schließlich in flüssigem Stickstoff in einem entsprechendem Gefäß plaziert wurden.

2.2.7 Sondenherstellung für den Northern-Blot

2.2.7.1 Chemische Transfektion

Transfiziert wurden die Plasmide siehe 2.1.7.2 in unter 2.1.7.1 aufgeführte Bakterienstämme, nach folgendem Protokoll. Zunächst wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und zu 100 µl in 2 ml Reaktionsgefäße pipettiert und mit 1,7 µl β-Mercaptoethanol versetzt (Endkonzentration 25 mM). Danach wurden die Zellen 10 min auf Eis inkubiert und dabei alle 2 min vorsichtig überkopf gemischt. 0,5 µg DNA wurden in die Zellsuspension gegeben und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Die eigentliche Transfektion erfolgte durch einen Hitzeimpuls von 42°C für 45 sec und der sofort anschließenden Inkubation auf Eis für weitere 2 min. Danach wurden 0,9 ml auf 42°C vorgewärmtes SOC-Medium (siehe 2.1.5) zugegeben, gemischt und 1 h bei 37°C und 225-250 rpm inkubiert. Danach wurden 20 µl der Zellsuspension auf LB-Agarplatten (50 µg/ml Ampizillin, 40 µl x-Gal-Stammlösung (20 mg/ml)/Platte und 4 µl IPTG-Lösung) ausplattiert (Rezepte unter 2.1.5) und ü.N. bei 37°C im Wärmeschrank inkubiert.

Um die transfizierten Bakterien, zu erkennen, wurden diese mittels Blau-Weiß-Selektion differenziert. Das unphysiologische Substrat des Enzyms β-Galactosidase X-gal (5-Brom-4-Chlor-3-indolyl-β-D-galactosid) wird durch dessen Abbau in einen schwer löslichen Indigofarbstoff umgesetzt und färbt somit alle Zellen blau, die das Enzym β-Galactosidase herstellen. Dieses Enzym wird nur exprimiert, wenn die Zellen das intakte Plasmid aufgenommen haben. Um diese Farbreaktion zu forcieren, wurden die Agarplatten am nächsten Morgen bei 4°C etwa 1 h inkubiert. Einzelne blaue Bakterienklone des Vereinzelungsausstriches wurden von den LB-Agarplatten gepickt und in je 5 ml LB-Medium mit 10 µl Ampicillin-Stammlösung (siehe 2.1.5)

überführt. Die Aufzucht erfolgte während einer Inkubation ü.N. bei 37°C und 225-250 rpm.

2.2.7.2 Aufbewahrung der transformierten Bakterien

Von den Über-Nacht-Kulturen wurden 150 µl Bakterienlösung mit 50 µl LB-Medium und 50 µl einer 15%igen Glycerinlösung gemischt und bei -80°C eingefroren. Diese Kulturen sind so konserviert relativ stabil und haltbar. Die Möglichkeit die Agarplatten mit Parafilm zu versiegeln und bei 4°C zu lagern, wurde verwendet, wenn die Bakterien in kurzer Zeit weiterverarbeitet werden sollten.

2.2.7.3 Präparation der Plasmid-DNA mittels alkalischer Lyse

Die Über-Nacht-Kulturen wurden in 2 ml Reaktionsgefäße verteilt und 1 min bei 10000 x g bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in Gigaseptlösung FF^R (Schülke & Mayr, Norderstedt) entsorgt, das Pellet mit 0,3 ml der Lösung 1 (siehe 2.1.5) resuspendiert und 15 min bei RT inkubiert. Mit 0,3 ml der Lösung 2 (siehe 2.1.5) wurden diese Lösungen vorsichtig gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Danach wurden 0,3 ml der Lösung 3 (siehe 2.1.5) dazugegeben, vorsichtig gemischt und 15 min bei 20000 g für 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 500 µl RotiPhenol (Roth, Karlsruhe) gemischt, gevortext und anschließend 5 min bei 20000 g und 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß mit 500 µl Chloroform gevortext und wieder 5 min bei 20000 g und 4°C zentrifugiert. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt und anschließend wurde der Überstand mit gleichem Anteil Isopropanol gemischt und gevortext, 15 min auf Eis inkubiert und 30 min bei 20000 g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde dann mit kaltem 70%igem Ethanol gewaschen, vacuumgetrocknet und in 50 µl H₂O resuspendiert.

2.2.8 Northern-Blot-Analyse

2.2.8.1 Restriktionsspaltung zur Linearisierung der Plasmide

(Sambrook et al., 1989)

Die Gruppe der Restriktionsendonukleasen gehört zu den bakteriellen Enzymen, die DNA-Doppelstränge an bestimmten, meist palindromischen Sequenzen spalten (Roberts, 1983). Der Einsatz von Restriktionsendonukleasen erfolgte immer nach den Angaben der Hersteller (mit den mitgelieferten Puffern, den empfohlenen Enzymmengen und bei den angegebenen Temperaturoptima). Die Plasmide wurden mit den in Tabelle 3: angegebenen Restriktionsendonukleasen linearisiert und mittels gelelektrophoretischer Trennung und einem 100bp-Marker auf die richtige Größe hin überprüft. Zur Inaktivierung der Restriktionsendonukleasen wurden die ausgesuchten Ansätze einer Proteinkinase K- Behandlung für 1h bei 37°C unterzogen; der Ansatz sah wie folgt aus:

- x µl Linearisierte-Plasmid-DNA (~5µg)
- 5 µl 10x Proteinase K Puffer (siehe 2.2.10.3)
- 2,5 µl 10% SDS
- 3 µl Proteinase K - Stocklösung (1,64mg/ml, siehe 2.2.10.3)
- x µl Aqua bidest autoklaviert
- 50 µl = Gesamtvolumen

Anschließend wurden diese Proben einer Phenol / Chlorophorm - Extraktion unterzogen. Dazu wurden die Proben 1:2 mit Rotiphenol (Roth, Karlsruhe) versetzt, gemischt und 15 min bei 4°C und 13000 rpm (Biofuge) zentrifugiert. Die obere Phase wurden in einem neuen Gefäß mit Chloroform 1:2 erneut gemischt und wie oben beschrieben zentrifugiert. Wieder wurde der Überstand in ein neues Gefäß überführt und zur Absättigung des SDS mit 2 M NaCl gemischt. Anschließend wurde die DNA mit dem gleichen Volumen kaltem 100%igem Ethanol und 2,5 µl NaAc (3M/pH5,2) bei -20°C 1 h gefällt und danach 30 min bei 4°C und 13000 rpm pelletiert.

Diese Pellets wurden mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 20 µl autoklaviertem A.bidest aufgenommen. Die Kontrolle der Proben erfolgte auf einem 1% Agarosegel, 0,5 µg pro Probe. Zur Orientierung diente die 100bp-DNA-Massladder.

2.2.8.2 RNA-Sondenherstellung

Die Sondenmarkierung wurde mit dem RNA-Labeling Kit von Boehringer Mannheim durchgeführt und bei Bedarf etwas modifiziert. Das bedeutet die DNA wurde mit einer Klenow-Polymerase durch „random primed“ Einbau von Digoxigenin-markiertem Desoxyuridintriphosphat in vitro transkribiert und markiert.

Für den RNA-Labeling-Ansatz wurden folgende Komponenten gemischt:

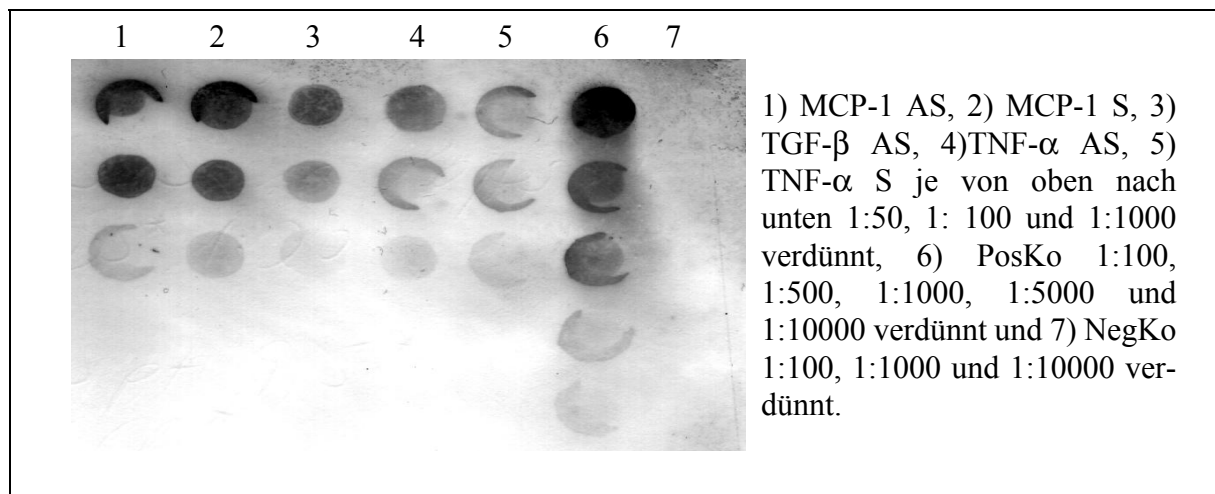
- 1 µl RNase Inhibitor (20U/ml)
- 5 µl (1µg) DNA Lsg. (linearisiert, Proteinkinase K behandelt und aufgereinigt)
- 2 µl 10x Transkriptionspuffer
- 2 µl 10x dNTP (+DIG-UTP)
- 2 µl der entsprechenden Polymerase (20U/µl)
- 8 µl Aqua bidest (autoklaviert)
- 20 µl Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde gut gemischt, kurz anzentrifugiert und 2 h bei 37°C inkubiert.

Um die Plasmid-DNA aus den Proben zu eliminieren, wurden diese mit 2 µl RNase freier DNase I gemischt und 15 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 2 µl EDTA-Lsg. (0,2 M / pH 8,0) wurde die Reaktion gestoppt. Mit 2,5 µl 4M LiCl und 75 µl 100% kaltem Ethanol wurden die Proben bei -20°C für 1 h gefällt, dann bei 13000 rpm (Biofuge) 4°C für 15 min zentrifugiert und mit Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in autoklaviertem Aqua bidest mit 1 µl RNase-Inhibitor aufgenommen.

2.2.8.3 Bestimmung der Markierungseffizienz mittels Dotblot

Zur Bestimmung der Markierungseffizienz und Titration der Arbeitsverdünnungen wurden die Proben, wie in Abbildung 6: aufgezeigt, verdünnt und auf eine Nylonmembran mittels Vakuum und Dot-Blot-Kammer (S2035 oncor, Dallas, Texas, USA) aufgebracht. Die Membran wurde getrocknet und bei 1,23 Joule/cm² vernetzt. Danach wurde die Membran 2 x bei RT kurz in Waschpuffer (siehe 2.1.5) gewaschen, 30 min bei RT in Puffer 2 (siehe 2.1.5) inkubiert, um die noch freien Bindungsstellen der Membran abzusättigen und mögliche unspezifische Bindungen des mit alkalischer Phosphatase gekoppelten Antikörpers zum Nachweis der DIG-Markierung (anti-DIG-AP-Fab-Fragment, Roche, Mannheim) zu unterbinden. Danach wurde die Membran 30 min bei RT in Puffer 2 unter Zusatz des anti-DIG-AP-Fab-Fragments (1:5000) inkubiert und ein weiteres mal 30 min bei RT in Puffer 2 abgesättigt. Danach wurde die Membran erst 2 x 15 min in Waschpuffer (siehe 2.1.5) gewaschen, danach 2 x 2 min in Puffer 3 für Northern-Blots (siehe 2.1.5), um sie für den Farbnachweis in ein alkalisches Milieu zu überführen. Die Visualisierung erfolgte mittels BCIP (5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat), einem Substrat für die alkalische-Phosphatase. Durch die hydrolytische Spaltung des Substrates der relativ unspezifisch arbeitenden alkalischen Phosphatase entsteht ein tiefblauer unlöslicher Indigoniederschlag und H⁺-Ionen. Diese Ionen induzieren die Reduktion des als Farbverstärker eingesetzten NBTs (Nitroblau- Tetrazolium) zu einem purpurfarbigem Diformazan. Beide Substrate (Boehringer, Mannheim) wurden in Puffer 3 für Northern-Blots verdünnt (siehe 2.1.5). Die Membran wurde zum Abschluß in Aqua dest gespült, luftgetrocknet und zur Aufbewahrung in eine handelsübliche Haushaltsfolie eingeschweißt.

Abbildung 6: Dot blot der markierten RNA-Sonden

2.2.8.4 Gelelektrophoretische Auftrennung der RNA

(Fourney et al., 1988)

Die Gesamt-Hoden-RNA-Proben für die Northern-Blot-Analyse wurden wie unter Punkt 2.2.6.5 beschrieben extrahiert und wie unter Punkt 2.2.4.2 analysiert, um sie dann auf die gewünschten Konzentrationen einzustellen, zu aliquotieren und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C einzufrieren.

Zur Reinigung der RNA von genomischer DNA, wurden die Proben mit DNase I gereinigt. Hierzu wurden die Proben in einem Ansatz wie folgt für 30min bei 37°C inkubiert, dem Temperaturoptimum der DNase I.

Einzelansatz für DNase I Verdau:

10 μg RNA auf 16,5 μl mit RNase freiem H_2O angepaßt
 0,5 μl RNasin (40u/ μl)
 1 μl DNase I (10u/ μl)
 2 μl 10x DNase I Puffer
 20 μl Gesamtvolumen

Nach Abschluß des Verdau wurden die Proben zur Enzymdegeneration 10 min bei 70°C inkubiert.

Zur Überprüfung der RNA-Qualität wurden die Proben gelelektrophoretisch getrennt. Durch die in der Gesamt-RNA enthaltenen ribosomalen Bestandteile 28 S rRNA (3,95 kb), der 18 S rRNA (1,99 kb) und der 5,8 S rRNA (0,123 kb), die in einem „sauberen“ RNA-Extrakt als klare Banden zu identifizieren sind, lassen sich Abschätzungen über den Reinheitsgrad und den Abbau der extrahierten RNA treffen. Dazu wurden alle verwendeten Gerätschaften mit 3% H_2O_2 vorinkubiert, um sie von RNAsen zu befreien. Da RNA-Moleküle stark dazu neigen Sekundärstrukturen zu bilden und so ihr Laufverhalten zu verändern, erfolgte die Auftrennung in einem speziellen RNA-Gel mit Formamid (siehe 2.1.5).

Etwa 5 μg RNA wurden mit RNase-freiem Wasser auf 5 μl Probenvolumen eingestellt und mit 20 μl RNA-Probenpuffer (2.1.5) gemischt, 10 min bei 70°C linearisiert und anschließend direkt auf Eis gestellt. Mit 1 μl 0,1%igem Ethidiumbromid gemischt und in die Slots des RNA-Gels pipettiert. Als Laufpuffer diente 1 x MOPS (2.1.5), der Gellauf erfolgte bei $\sim 80\text{V}$ für ca. 2 h. Anschließend wurden die Proben unter UV-Licht visualisiert und fotografiert (siehe 2.2.9.6).

2.2.8.5 Transfer der RNA auf Nitrocellulosemembranen mittels Vakuum-Blot

Nach dem Gellauf und der fotografischen Dokumentation wurde das RNA-Gel in 0,05 N NaOH 30 min inkubiert. Bei großen RNA-Molekülen kommt es hierbei zur partiellen Hydrolyse. Dies hat zur Folge, daß die kleineren Fragmente leichter auf die Membran transfundieren.

Während dieser Inkubationszeit wurden alle Geräte (Vakuumbloater Model 785, Pumpe und Flüssigkeitsfalle) entsprechend den Herstellerangaben aufgebaut und vorbereitet.

Danach wurde das Gel kurz in autoklaviertem Wasser gespült und in 10x SSC equilibriert. Anschließend erfolgte der Zusammenbau des Transferblotes nach Herstellerangaben.

Die Blotdauer betrug 90 min bei 5 Hg/inch.

Nach dem Blot wurden die oberen Anteile der Blotaparatur entfernt, der Puffer abgelassen und die Gelslots auf der Membran angezeichnet, bevor das Gel endgültig von der Membran abgehoben wurde, um später eine eindeutige Größenzuordnung zu ermöglichen. Die Transfereffizienzen wurden auf einem UV-Schirm überprüft. Die Membran wurde auf Filterpapier getrocknet und von beiden Seiten mit 1,23 Joule/cm² vernetzt. Die Membranen wurden entweder direkt der Hybridisierung (siehe 2.2.8.6) unterzogen oder bei -20°C eingefroren.

2.2.8.6 Hybridisierung der RNA-Blots mit markierten cRNA-Sonden

Hierbei werden die gesuchten RNAs mit den Dig-UTP-markierten cRNAs hybridisiert und indirekt über ein anti-Dig-AP-Fab-Fragment detektiert. Die alkalische Phosphatase setzt das lumineszierende Substrat CDP-Star Tropix (5 µg/ml, Applera Weiterstadt) unter der Emission detektierbarer Photonen um.

Benötigte Lösungen:

Blocking-Reagenz:

10% Blocking-Reagenz (Boehringer, Mannheim)
in Puffer 1
autoklavieren, bei 4°C lagern

20 x SSC:

175,3 NaCl (3M)
88,2 g Na-citrat (0,3M)
ad 1 l, pH7,0
autoklavieren, bei RT lagern

Puffer 1:

11,61 g Maleinsäure
8,77 g NaCl
ad 1 l, pH7,5 mit NaOH
autoklavieren, bei RT lagern

Hybridisierungspuffer:

25 ml 20 x SSC
1 ml 10% Laurylsarcosin
200 µl 10% SDS
50 ml Formamid
ad 100 ml mit H₂O

Puffer 2:

2% Blockingreagenz
in Puffer 1

Waschpuffer:

0,5% SDS
in Puffer 1

Puffer 3:

10 ml 1M TRIS pH9,5
2 ml 5M NaCl
5 ml 1M MgCl₂
ad 100 ml mit H₂O

Zunächst wurde die Membran für 5 min in 0,05 N NaOH zur Denaturierung der Proben inkubiert und zwei mal 5 min in 2 x SSC gewaschen. Die Prähybridisierung erfolgte in einem Hybridisierungssofen in speziellen Hybridisierungsröhrchen (HYBAID HB-OV-BS, Hybaid Lt. Teddington, UK) bei 68°C in 5 ml Hybridisierungspuffer.

Die Sonden wurden auf Eis aufgetaut, entsprechend aliquotiert, 10 min bei 95°C denaturiert, auf Eis gestellt und in 5 ml Hybridisierungspuffer (vorgewärmt auf 68°C) aufgenommen. Die zur Prähybridisierung verwendeten Puffer wurden verworfen und durch die Sonden enthaltenen Lösungen ersetzt. Die Hybridisierung erfolgte bei 68°C ü.N..

Danach wurden die Hybridisierungslösungen abgegossen und in Falconröhrchen bei -20°C eingefroren. Diese können bis zu vier mal verwendet werden.

Die Membranen wurden wie folgt gewaschen: 3 x 10 min in 2 x SSC / 0,1 % SDS bei 68°C, 2 x 10 min in 0,1 x SSC / 0,1 % SDS bei 68°C und 2 x 5 min in Waschpuffer bei RT. Anschließend wurden die Membranen 30 min in Puffer 2 bei RT equilibriert. Die Detektion wurde eingeleitet mit einer Inkubation der Membranen mit anti-DIG-AP-Fab-Fragment (Roche, Mannheim) 1:5000 in Puffer 2 bei RT für 30 min. Eine anschließende Inkubation mit Puffer 2 diente zur Auswaschung der nichtgebundenen Fab-Fragmente. Danach wurden die Membranen 2 x 15 min in Waschpuffer bei RT gewaschen und durch eine zweimalige Inkubation von 2 min in Puffer 3 (frisch angesetzt) auf die Substratumsetzung vorbereitet. Der Start der eigentlichen Umsetzung des Substrates CDP-Star 1:100 in Puffer 3 bei RT durch die alkalische-Phosphatase erfolgte für 5 min im Dunkeln. Anschließend wurden die Membranen luftblasenfrei in Haus-haltsfolien eingeschweißt und in Filmkassetten (IAMPLI TYPE XH 2001/03 mit Bleieinlage) mit einem Fuji Super RX 100NF Röntgenfilm bis zur gewünschten Stärke exponiert. Die anschließende Filmentwicklung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll (Agfa, Leverkusen).

2.2.9 RT-PCR

2.2.9.1 RNA-Präparation und Probenvorbereitung

Die Gesamt-Hoden-RNA-Proben wurden wie unter Punkt 2.2.6.5 beschrieben extrahiert und wie unter Punkt 2.2.4.2 analysiert, um sie dann auf die gewünschten Konzentrationen einzustellen. Zur Aufreinigung bezüglich der möglicherweise in den Proben verbliebenen genomischen DNA wurden alle Proben wie unter 2.2.8.4 beschrieben DNase I verdaut, anschließend aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C eingefroren.

2.2.9.2 Herstellung der cDNA mittels reverser Transkription (RT-PCR)

(Lee and Caskey 1990)

Die RNAs wurden mit Hilfe der Reversen-Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Hierbei wird die RNA in Anwesenheit eines Oligo(dT)15 Primers (Promega, Heidelberg) denaturiert. Die anschließende Zugabe der Reversen Transkriptase (200 U, M-MLV RNase H-minus, Promega Heidelberg) und der benötigten Nucleotide, initiiert die Entstehung der cDNA. Die Durchführung erfolgte nach folgendem Ansatz:

5 µl (ca2,5µg) RNA nach DNase I Verdau
2 µl Oligo (dT) 15 Primer
15 µl H₂O RNasefrei
Inkubation für 10 min bei 70°C, anschließend sofort auf Eis.
4 µl 10x RT-Puffer (Promega)

2 µl dNTPs (10mM)
0,5 µl RNAsin (40u/µl)
6,5 µl H₂O RNasefrei
als Mastermix auf 42°C vorwärmen.
Proben auf 42°C vorwärmen,
1 µl M-MLV RT (Promega) 1:3 in H₂O RNasefrei zu Mastermix
Mastermix, inklusive M-MLV RT, zur Probe
Inkubation 50 min bei 42°C
Enzyminaktivierung 10 min bei 70°C

Bei niedrig konzentrierten RNA-Proben wurde nach der üblichen RT-PCR das sogenannte AMOC-Verfahren (arithmetic multiplication of cDNA nach Mangan and Butcher, 1993) angeschlossen, um die gewonnene cDNA-Konzentration zu erhöhen. Der ersten Transkription wurden direkt eine Enzymdeaktivierung und Denaturierung der Templates und Primer von 10 min 85°C und 3 min 95°C angeschlossen. Nach der Zugabe von weiteren 100 U M-MLV RT, 1:3 in RNase freiem H₂O, erfolgte eine erneute Transkriptionsphase von 20 min bei 42°C. Auch hier wurde zum Abschluß eine Enzymdeaktivierung von 10 min bei 70°C durchgeführt. Die Proben wurden bis zur weiteren Verwendung bei -20°C eingefroren.

2.2.9.3 Primer-Optimierung

Durch die große Variabilität der DNA-Matrize und der verwendeten Primer ist es unbedingt notwendig jede einzelne PCR-Reaktion zu optimieren. Dazu gehört zuerst das Ausrechnen der theoretisch optimalen Annealingtemperatur nach folgender Gleichung:

$$T_m = 69,3 + 0,41(\% \text{ GC}) - 650/L$$

Wobei L die Anzahl der Basen des zu berechnenden Primers und % GC dessen prozentualer Anteil an den Basen Guanin und Cytosin ist. Die so errechnete Schmelz- oder Annealingtemperatur (T_m) ist lediglich ein Richtwert und durch praktische Test-PCRs zu verifizieren. Grundsätzlich kann man sagen, je höher die Annealingtemperatur ist, um so spezifischer erfolgt die Primerbindung. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die richtige Zusammensetzung des Puffers. Dabei spielt zum einen der pH-Wert und zum anderen die Ionenkonzentrationen von Mg^{2+} - und K^+ - Ionen, die als Chloridsalze vorliegen, eine entscheidende Rolle (Mc Pherson *et al.*, 1991). Sind diese Parameter richtig gewählt, ist die Ausbeute maximal und das Produkt spezifisch. Zusätze wie Formamid oder DMSO können gegebenenfalls die Synthese unspezifischer Nebenprodukte unterdrücken. Ebenfalls genau titriert sollte der Einsatz der Taq-Polymerase sein, der bei zu hohem Einsatz zur Bildung von unspezifischen Produkten führt. Bei optimalen Versuchsbedingungen hat die Taq-Polymerase eine Syntheserate von 10^3 Basenpaaren pro Minute, dadurch kann für jedes PCR-Produkt die erforderliche Elongationszeit errechnet werden.

2.2.9.4 Verwendete Primer

Tabelle 8: Informationen zu den verwendeten Primern

Name des Primers	Oligonucleotidsequenz: sense antisense	Fragment -größe	Annealing- temperatur
GAPDH (Glycerin-Aldehyd-Phosphat-Dehydrogenase)	5'-CGT CTT CAC CAC CAT GGA GA-3' 5'-CGG CCA TCA CGC CAC AGT TT-3'	300bp	60°C
CD5 (clusters of differentiation Nr.5)	5'-CAT CAT CCT GAC CCT GGT ACT CCT G-3' 5'-GGA TGT GCT TGG TCT TTG TTG CTG G-3'	380bp	60°C
IL-7p (Interleukin 7 precursor)	5'-GCT GCC GGT CAC ATC GTC TGA CTG-3' 5'-GCT TGT GCA GTT CAC CAG TGT TTG TG-3'	298bp	68°C
IL-8Rβ (Interleukin 8 Rezeptor beta)	5'-TCC TGC CGC TGC TCA TCA TGC TG-3' 5'-CTC GTT CTG GCG TTC ACA GGT CTC-3'	211bp	68°C
IL-1R1 (Interleukin 1 Rezeptor Type1)	5'-GAG GGA ACT ATA CTT GCC GCA CGT C-3' 5'-GAT CGT CCC ATT CAA TTT CCG ACC C-3'	243bp	68°C

2.2.9.5 Amplifizierung der differenziell exprimierten Gene (CD5, IL-1R1, IL-7 precursor und IL-8R beta) mittels PCR

(Mullis et al., 1986; Mullis und Faloona, 1987; Saiki et al., 1988)

Die PCR (Polymerase Chain Reaktion) dient der selektiven Anreicherung definierter DNA-Abschnitte. Die PCR erfolgte in Thermocyclern mit beheizbarem Deckel, so daß die Proben nicht mehr mit Mineralöl überschichtet werden mußten, um deren Verdunstung zu verhindern.

Die Reaktionsansätze wurden in einem für die *Taq*-Polymerase optimalen Puffer angesetzt. Diese *Taq*-Polymerase ist ein Bestandteil des Bakteriums *Thermus aquaticus* und toleriert auch wiederholte Temperaturen von 94°C. Bei dieser Temperatur wird die doppelsträngige DNA, die als Vorlage dient, in Einzelstränge getrennt (Denaturierung). Der nächste Schritt ist die Anlagerung der kurzen Startsequenzen (Primer) an die einzelsträngige DNA (Annealing). Dies geschieht bei einer für jedes Primerpaar spezifischen Temperatur (Annealingtemperatur), die von der jeweiligen Länge und dem GC-Gehalt der Sequenzen abhängig ist. Während der nächsten Phase werden die jeweiligen dNTPs (Desoxynucleotidtriphosphate), die in ausreichender Menge dem Ansatz zugesetzt wurden, bei 72°C, dem Temperaturoptimum der Polymerase, in 3'-Richtung entsprechend den Vorlagen gegenläufig an die freien OH-Enden der vorherigen Base angehängt (Elongation). Dieser Zyklus, Denaturierung, Annealing und Elongation, wird 25-35 mal wiederholt, dabei dienen die neu synthetisierten DNA-Abschnitte, die nur noch der durch die Primer definierten Länge entsprechen, ebenfalls als Matrizen. Der Anteil dieser amplifizierten DNA verdoppelt sich mit jedem Zyklus, so daß nach n Zyklen ein theoretisches Maximum von 2ⁿ DNA-Strängen zu erwarten ist.

Die Reaktion wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

Initialdenaturierung	T0: 3 min	98°C
20 bis 35 Zyklen zur exponentiellen Anreicherung	T1-T3	
Denaturierung	T1: 40 sec	94 °C
Annealing	T2: 40 sec	etwa 55-68°C
Elongation	T3: 45 sec	72°C
Abschließende Synthese	T4: 10 min	72°C
Warteschleife bis zur Entnahme	T5: unendlich	4°C

Die Reaktionsansätze ergaben sich aus folgendem:

10 x PCR-Puffer inkl. Magnesiumchlorid	2,5 µl
Primer forward (50pM/µl)	0,5 µl
Primer reverse (50pM/µl)	0,5 µl
cDNA	1-2 µl
dNTPs (je 10 mM)	0,5 µl
<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)	0,125 µl
Milli-Q-Wasser	ad 25 µl

2.2.9.6 Auftrennung der amplifizierten Proben mittels Agarose-Gelelektrophorese

(Sambrook et al., 1989)

Je nach Gel (Agarosekonzentration) und Elektrophoreseapparat (Konventionell oder Pulsfeld), können Nucleinsäurefragmente in einer Größe von weniger als 100 bp bis zu mehreren Mb aufgetrennt werden. Um die resultierenden Banden sichtbar zu machen kann man mehrere Möglichkeiten ausschöpfen, z.B. Ethidiumbromid, SYBR-GreenII, P³², Silber oder andere Nucleinsäurebindende Reagenzien. In dieser Arbeit wurde Ethidiumbromid verwendet, welches entweder direkt dem Gel zugegeben oder als Färbepad (beides 0,1%ig, 1:10000 verdünnt) verwendet wurde. Ethidiumbromid ist ein aromatisches Kation. Es besitzt die Eigenschaft, sich zwischen die DNA-Doppelstränge zu legen, zu interkalieren, und dort durch Anregung mit UV-Licht zu fluoreszieren. In dieser Arbeit hatte die anregende UV-Strahlung eine Wellenlänge von 302 nm und die daraus resultierende Fluoreszenzstrahlung eine Wellenlänge von 560 nm. Da jede Nucleinsäure über eine anteilig konstante Menge negativ geladener Phosphatreste verfügt, läßt sie sich in einem elektrischen Feld auftrennen und läuft immer in Richtung der Anode. Zur Trennung der DNA-Fragmente, die bei der PCR entstanden, wurden Agarosekonzentrationen (Gibco) von 1-3% gewählt, die in 1 x TBE-Puffer (siehe 2.1.5) aufgekocht und mit Ethidiumbromid versetzt wurden. Zum Auspolymerisieren wurde die Lösung zunächst auf 50°C gebracht und diese in spezielle Gelschlitten gegossen. Je nach Probenvolumen wurden Gelkämme mit 1 mm (bis 20 µl) oder 2 mm (bis 50 µl) gewählt, die die Aussparung der späteren Slots bildeten. Mit 1 x TBE als Laufpuffer (siehe 2.1.5) und dem entsprechenden Ladepuffer (siehe 2.1.5) wurden die Proben bei 70-120V für 1-3 h getrennt und mit UV-Licht (Transilluminator, MAGV GmbH Rabenau) visualisiert. Zur Dokumentation wurden die Ergebnisse mit einer Polaroid Kamera (Polaroid MP-4 Land Camera) fotografiert (Film Polaroid 667 ohne Negativ).

2.2.9.7 Densitometrische und statistische Auswertung

Die Polaroidfotos der Agarosegele wurden mit einem Scanner (Astra 600P, UMAX, Willich) und einem Notebook (Toshiba Satellite 4090XCDT, Toshiba, Neuss) digitalisiert und mit der im Internet erhältlichen Software ScionImage Beta 4.0.2 (Scion Corporation) densitometrisch quantifiziert. Die erhaltenen Daten wurden in Excel-Tabellen (Microsoft Office Paket, Microsoft, München) eingegeben und mit Hilfe der Software SigmaStat 2.0 (SPSS Inc.) statistisch durch eine ONE WAY ANOVA und dem Bonferoni t-test ausgewertet.

2.2.10 In-Situ-Hybridisierung (ISH)

2.2.10.1 Methode

Bei der ISH wird DNA oder RNA in Gewebeschnitten oder Kulturzellen an ihrem funktionellen Ort, also in-situ, durch die Hybridisierung mit definierten und markierten DNA- oder RNA-Sonden nachgewiesen. Die Gewebe oder Zellen werden dazu unter geeigneten Bedingungen (hier ist besonders die Kontamination mit DNasen und RNasen zu vermeiden) auf Objektträger aufgezogen und entsprechend vorbereitet.

2.2.10.2 Sonden und Gewebeschnitte

Die Sonden für die in-situ-Hybridisierung wurden wie unter 2.2.8.2 beschrieben hergestellt und je nach Markierungseffizienz verdünnt.

Die Gewebeschnitte wurden wie unter 2.2.2.2 und 2.2.2.4 (semi-steril) vorbereitet und für die in-situ-Hybridisierung unter geeigneten Bedingungen aufbewahrt. Kryogewebe wurden aus dem Gefrierschrank bei -20°C entnommen, fixiert in Isopropanol (4°C, 10 min) und anschließend für 2 x 5 min in autoklaviertem Membra Pure Wasser gespült. Paraffineingebettete Gewebe wurden in sterilen Küvetten bei 4°C gelagert. Direkt vor Gebrauch wurden diese deparaffiniert (60°C, 15 min) anschließend in Xylol (2 x 10 min) und der absteigenden Ethanolreihe (95%, 80% und 70%, je 5 min) sowie 2 x 5 min in autoklaviertem Membra Pure Wasser rehydriert.

2.2.10.3 Verwendete Lösungen für die in-situ-Hybridisierung:

1 N NaOH	Essigsäureanhydrid
5 N NaCl	Formamid
Deparaffinierung und Dehydratisierung:	
	Xylol zwei Küvetten
	96%, 80% und 70% Ethanol mit autoklaviertem Membra Pure
	je eine Küvette
10 X PBS:	
	82 g NaCl (1,4 M)
	4 g K ₂ HPO ₄ (30 mM)
	10 g Na ₂ PO ₄ (70 mM)
	2 g KCl (27 mM)
	ad 1l mit Membra Pure und pH 7,4
	autoklaviert und bei RT aufbewahrt
1 x Proteinase K Puffer:	
	1,2 g Tris (100 mM)
	1,46 g EDTA (50 mM)
	ad 100 ml mit Membra Pure, autoklaviert
	pH 8,0, aufbewahrt bei -20°C
Proteinase K Lösung:	
	1 mg Proteinase K ad 1 ml autoklaviertem Membra Pure
	aliquotiert aufbewahrt bei -20°C

4% PFA Vor-Lösung:

20 g Paraformaldehyd (4% w/v)
ca. 30 Tropfen 1M NaOH
450 ml autoklaviertes Membra Pure
lösen im 60°C Wasserbad
aufbewahrt bei 4°C

PFA-Gebrauchslösung:

90 ml 4% PFA Vor-Lösung
10 ml 10 X PBS

TEA:

7,45 g (6,65 ml) Triethanolamin (0,1 M)
ad 0,5 l autoklaviertem Membra Pure pH 8,0
nicht autoklaviert

20 x SSC:

175,3 g NaCl (3 M)
88,2 g Na-citrat (0,3 M)
ad 1 l mit Membra Pure, pH 7,0, autoklaviert

Maleinsäurepuffer:

11,6 g Maleinsäure (0,1 M)
8,77 g NaCl (0,15 M)
ad 1 l mit Membra Pure, pH 7,5, autoklaviert

10 x Puffer I:

60,5 g Tris (1 M)
43,8 g NaCl (1,5 M)
ad 500 ml mit Membra Pure, pH 7,5, autoklaviert

Puffer II:

2% Blocking Reagenz (Boehringer, Mannheim)
in Maleinsäurepuffer
0,5% BSA (sterilfiltriert)
in 2 ml Aliquots bei -20°C gelagert

2 x Puffer IIIa:

48,5 g Tris (400mM)
23,4 g NaCl (400mM)
ad 1 l mit Membra Pure, pH 9,5, autoklaviert
gelagert bei RT

2 x Puffer IIIb:

40,7 g MgCl₂ (200mM)
ad 1 l mit Membra Pure, autoklaviert
gelagert bei RT

Puffer III.

Puffer IIIa und IIIb direkt vor dem Gebrauch gemischt (1+1)

Entwicklungspuffer:

20 ml Puffer III
5 mg Levamisol
100 µl NBT
70 ml BCIP
sterilfiltriert, sofort verwendet

50 x Denhardts:

1% (w/v) Ficoll 400
 1% (w/v) PVP (Polyvinylpyrrolidon 10 000)
 1% (w/v) BSA
 sterilfiltriert

Prähybridmix:

606 mg Tris (50 mM)
 730 mg EDTA (25 mM)
 117 mg NaCl (20 mM)
 ad 45 ml mit autoklaviertem Membra Pure, pH 7,5
 25 mg t-RNA (250 µg/ml)
 5 ml 50 x Denhardts (2,5 x)
 bis jetzt 2 x konzentriert, in 2 ml Aliquots bei -20°C gelagert
 direkt vor Gebrauch auftauen und mit
 je 2 ml 100% Formamid versetzen (50% (v/v))

10 x Grundmix:

1 ml 1M Tris pH 7,5 (200 mM)
 0,1 ml EDTA pH 8,0 (10 mM)
 25 mg t-RNA (5 mg/ml)
 5 mg poly A-RNA (1 mg/ml)
 1 ml 50 x Denhardts (10 x)
 ad 5 ml mit autoklaviertem Membra Pure
 in 200 µl Aliquots bei -20°C gelagert

50% Dextransulfad:

50 g Dextransulfad (50% (w/v))
 in 100 ml Membra Pure, sterilfiltriert

Hybridmix Beispiel für 100 µl:

50 µl 100% Formamid (50%)
 10 µl 10 x Grundmix (1 x)
 6,7 µl 5M NaCl (0,3 M)
 20 µl Dextransulfad 50% (10%)
 5 µl Sonde (5-10 ng/µl)
 ad 100 µl mit autoklaviertem Membra Pure

Der in-situ-Nachweis von RNA verlangt eine Versuchszeit von drei Tagen. Am ersten Tag wurden die in autoklaviertem Membra Pure stehenden Schnitte zunächst zur Deproteinierung für 10 min in 0,1 M HCl gestellt und anschließend 2 mal 5 min in 1 x PBS gewaschen. Die Freilegung der RNA erfolgte für 30 min bei 37°C in einer feuchten Kammer mit den für die jeweiligen Sonden und Geweben optimierten Proteinase K-Konzentrationen. Zunächst wurden alle Schnitte in 1 x PBS gesammelt und noch ein weiteres mal in 1 x PBS für 5 min gewaschen. Die freigelegte RNA wurde sofort für 15 min bei 4°C in der PFA-Gebrauchslösung fixiert und zwei weitere male für 5 min bei RT in 1 x PBS gewaschen. Zum Blockieren der positiven Ladungen, wurden die Schnitte in einem Färbeschiffchen in einer RNasefreien Küvette mit vorgelegten 0,5 ml Essigsäureanhydrid mit 200 ml TEA übergossen und während 20 min immer wieder auf und ab bewegt, um die entstehenden Essigsäureanhydridtropfen immer wieder neu zu verteilen. Wieder wurde zwei mal für 5 min in 1 x PBS und 1 mal 5 min in autoklaviertem Membra Pure gewaschen, um die Gewebeschnitte dann für je 5 min in der aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 80% und 95% Ethanol) zu entwässern. Anschließend wurden die Schnitte luftgetrocknet. Auf die trockenen Schnitte wurden je 100 µl Prähybridmix aufgetragen und für 2h bei der für die Sonden und Gewebe zuvor optimierten Temperatur in einem Hybridisierungsaufsatz inkubiert. Danach wurde der Prähybridmix mit einer Wasserstrahlpumpe und sterilen Pipettenspitzen vom Objekt abgesaugt und sofort, ohne den Schnitt antrocknen zu lassen, mit etwa 30 µl Hybridmix

überschichtet. Paraffineingebettete Gewebe wurden mit einem Deckgläschen versehen, bei Kryogeweben wurde darauf verzichtet. Die Hybridisierung der Sonde erfolgte ü.N. bei der entsprechenden Temperatur.

Am zweiten Versuchtag wurden, wenn vorhanden, die Deckgläschen vorsichtig vom Objekt entfernt und die Schnitte für 30 min und 53°C in 2 x SSC gestellt, anschließend für 1 h mit 1 x SSC plus 50% Formamid ebenfalls bei 53°C behandelt. Danach schlossen sich Inkubationen bei RT von 2 x 10 min in 0,5 x SSC, 1 x 10 min in 0,2 x SSC und 1 x 10 min in 1 x Maleinsäurepuffer an. Danach wurden die Schnitte aus den Küvetten genommen und direkt mit Puffer II überschichtet und für 60 min in einer feuchten Kammer bei RT für die nächste Inkubation vorbereitet. Die Lösung wurde wie oben beschrieben abgesaugt und die Schnitte mit anti-DIG-Fab-AP 1:500 in Puffer II in einer feuchten Kammer bei 4°C ü.N. inkubiert.

Am dritten Tag wurden die Schnitte für 2 x 15 min in Puffer I gestellt und 1 x für 2 min in Puffer III, um die Gewebe für die Entwicklung der Farbreaktion vorzubereiten. Anschließend wurden die Schnitte mit Entwicklungspuffer überschichtet und in feuchten Kammern bei 37°C im Wärmeschrank (dunkel) inkubiert. Die Entwicklung des Farbniederschlags kann zwischen wenigen Minuten und einigen Stunden ablaufen.

Bei der gewünschten Farbintensität wurden die Schnitte mit autoklaviertem Membra Pure gespült, evtl. gegengefärbt (Mayers Hämalan, Merck, Darmstadt) und wässrig eingedeckt (Immu-Mount, Shandon, Pittsburg, USA).

3 Ergebnisse

Die Experimentelle Autoimmun-Orchitis (EAO) bezüglich ihrer Auswirkungen auf die Gesamtkonstitution der Versuchstiere und die Veränderungen im Hoden der Tiere im Zusammenspiel der einzelnen Körpersysteme (Neuronales-, Immun- und Endokrines- System) wurde untersucht. Im Rahmen dieser Arbeit lag das Hauptaugenmerk auf dem Einfluß des Immunsystems.

Die Induktion der EAO sollte möglichst schonend für die Tiere erfolgen und mögliche Unterschiede einzelner Rattenstämme, bzw. genetische Prädispositionen aufgezeigt werden.

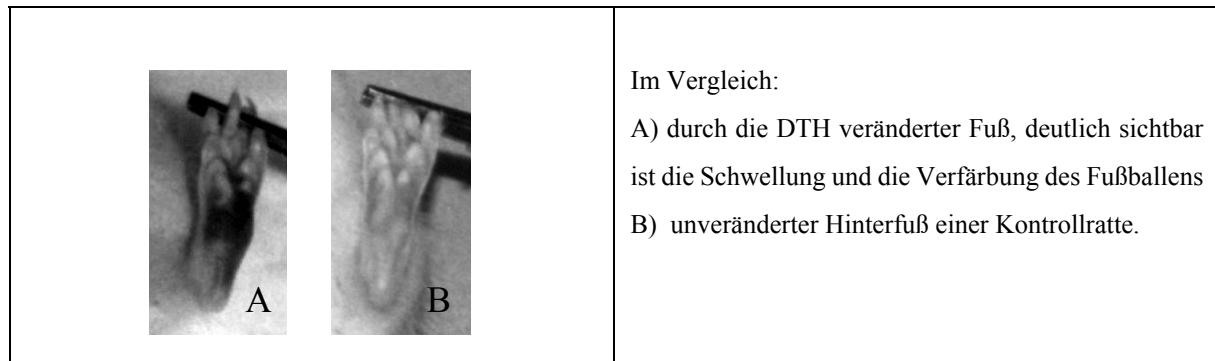
3.1 Einflüsse der Versuchsmanipulationen auf die Gesamtkonstitution, die Milz, den Thymus und den Hoden der Ratte

Um evtl. systemische Auswirkungen der Behandlungen auf die Ratten während des Versuches zu erfassen, wurden Parameter wie Körpergewicht, Organgewichte von Milz, Thymus und Hoden, sowie das Gesamterscheinungsbild der Ratten (Fellstruktur, Verhalten) während der Versuchsphasen dokumentiert.

3.1.1 Makroskopische Beurteilung und Gesamteindruck der Tiere während des Versuchs

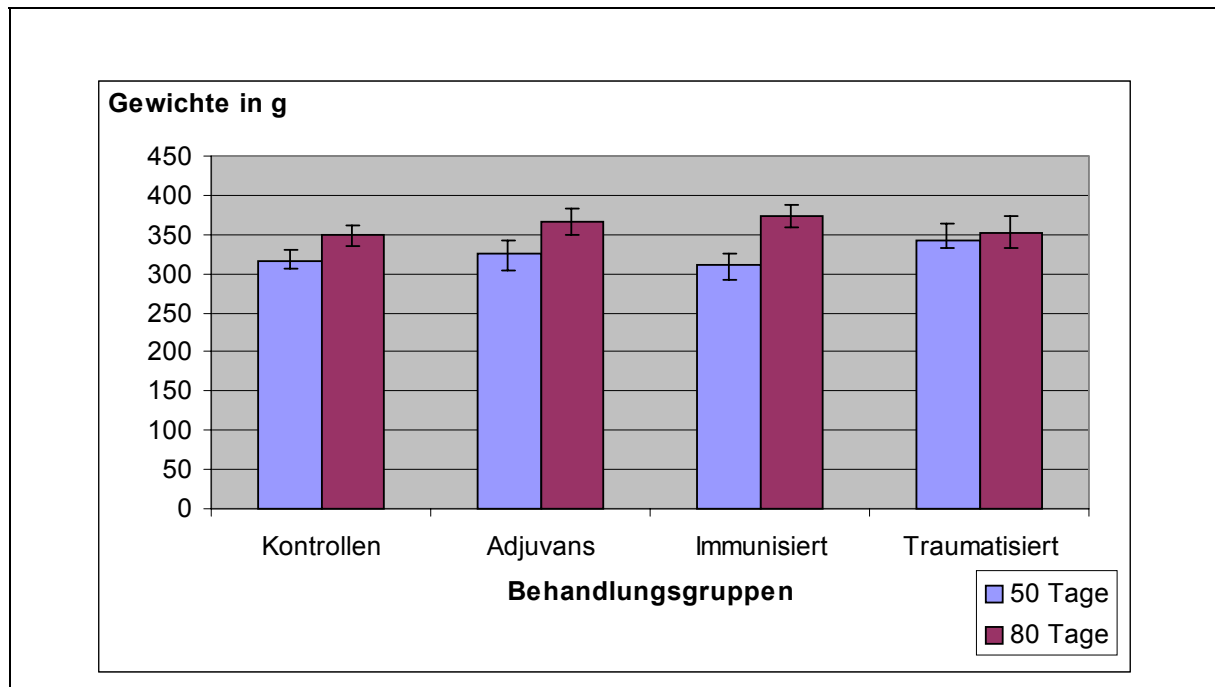
Während der Versuche wurden die Tiere mehrfach auf mögliche Krankheitszeichen untersucht. Während der Versuchszeit war das Verhalten im Käfig normal, Futter- und Wasseraufnahme nicht verändert. Die Haltung mit drei Tieren pro Käfig erschien als beste Haltungsform. Alleingehaltene Tiere wurden im Versuchsverlauf aggressiv. Während der 3. Versuchsreihe wurde einem Teil der Tiere ein Hodenhomogenat-Mykobakterium-Gemisch als Adjuvans u.a. in die hinteren Fußsohlen injiziert. Die mit diesem Toxin behandelten Tiere zeigten mit andauernden Versuchszeiten, fortschreitende DTH-Reaktionen der injizierten Fußballen. Die ohne Toxin, d.h. lediglich mit Hodenhomogenat und Adjuvans injizierten Tiere, zeigten keine Reaktion der Fußballen. Dies bedeutet, das mit der Injektionslösung ohne Toxin keine DTH auszulösen war (siehe Abbildung 7).

Abbildung 7 Delayed Type Hypersensitivity (DTH) der immunisierten Ratten aus Versuch 3



3.1.2 Auswirkungen der EAO auf das Körpergewicht der Ratte

Abbildung 8 Körpergewichte der Ratten bei Versuchsende



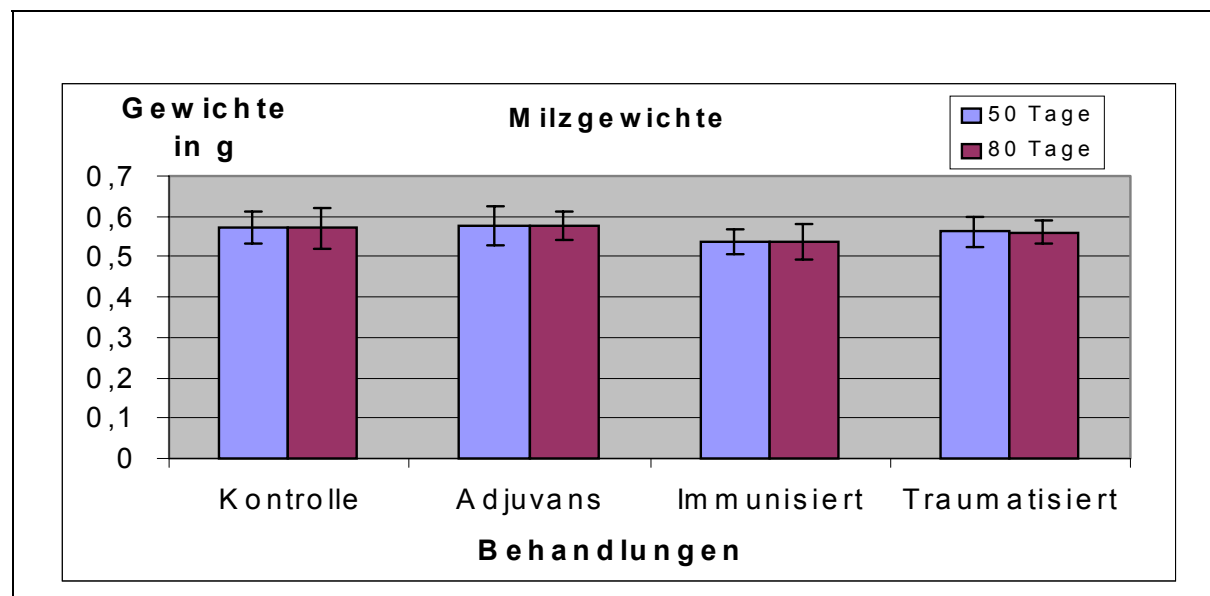
Graphische Darstellung der Gewichte der Versuchstiere kurz vor Versuchsende. Für keine der Behandlungsgruppen (Kontrollen, Adjuvans, Immunisiert oder Traumatisiert) konnten signifikante Gewichtsabweichungen festgestellt werden, die mit der Behandlung in Verbindung gebracht werden können. Die EAO-Induktion hat in diesem Versuchsansatz keine Auswirkung auf das Gewicht der Ratten.

Signifikante Abweichungen bezüglich des Körpergewichtes in den einzelnen Behandlungsgruppen konnten weder für die Tiere 50 Tage noch für die Ratten 80 Tage nach Behandlung festgestellt werden. Evtl. versuchsbedingte Irritationen werden also nicht durch veränderte Futteraufnahmen oder dessen Verwertungen begleitet. Die Behandlungen haben folglich keinen substantiellen Einfluß auf Allgemeinbefinden und Nahrungsaufnahme, bzw -verwertung.

3.1.3 Auswirkungen der EAO auf die Milz- und Thymusgewichte

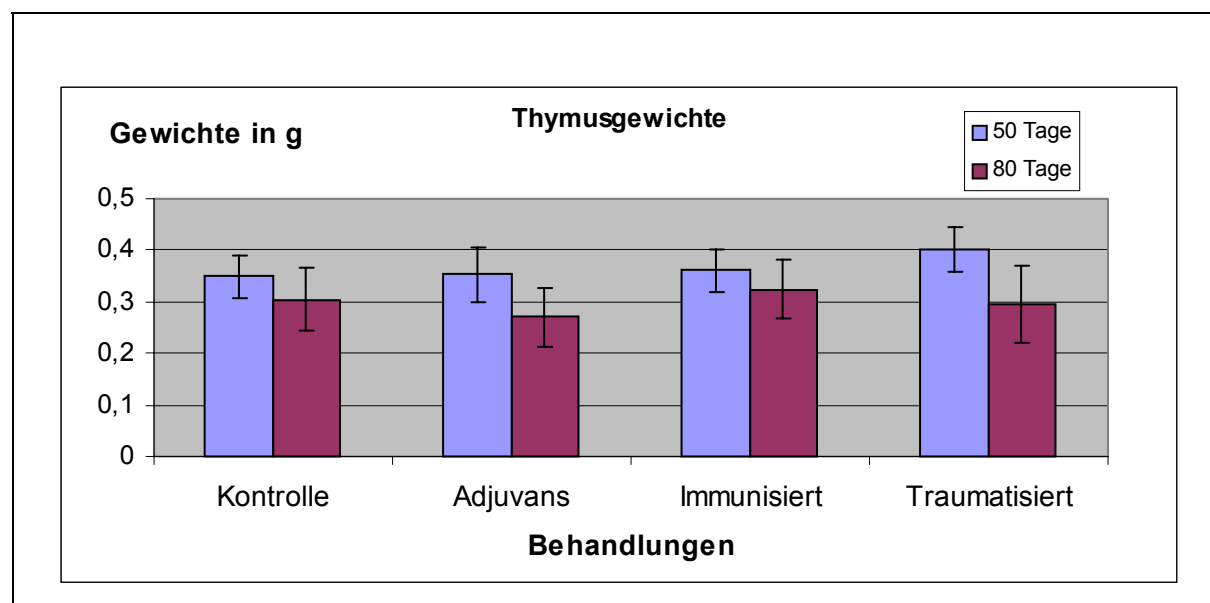
Um mögliche systemische immunologische Auswirkungen der EAO feststellen zu können, wurden Milz und Thymus bei Versuchsende entnommen und gewogen, bevor sie für die weiteren Untersuchungen prozessiert wurden.

Abbildung 9 : Milzgewichte der Versuchstiere



Graphische Dokumentation der Milzgewichte bei Versuchsende. Es konnten keine signifikanten Veränderungen der Milzgewichte in den einzelnen Versuchgruppen festgestellt werden.

Abbildung 10 : Thymusgewichte der Versuchstiere

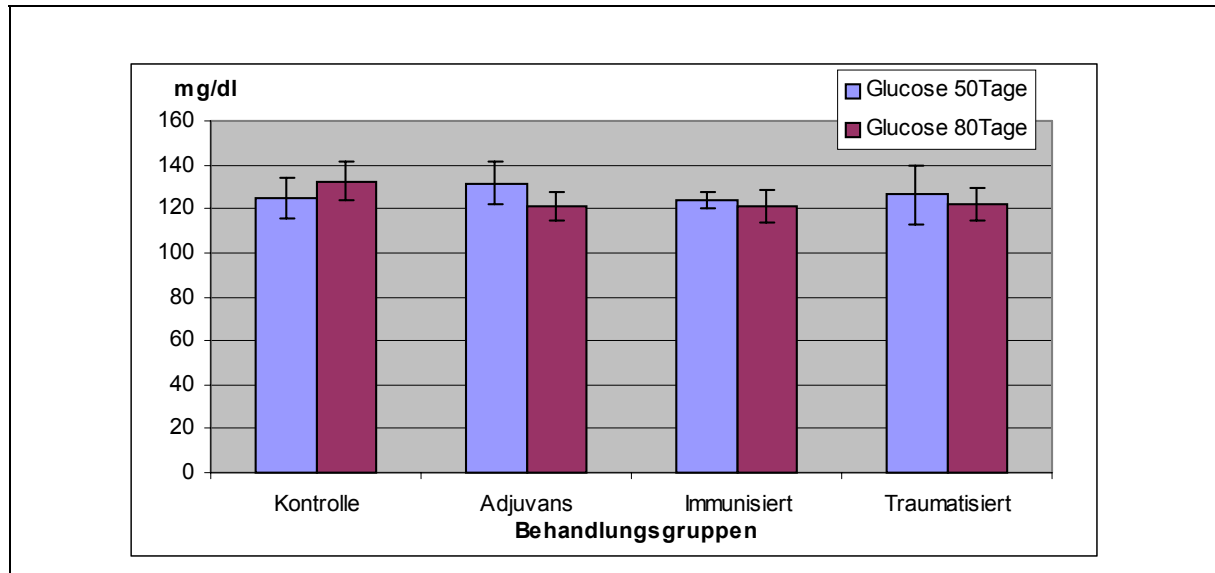


Dargestellt sind die Thymusgewichte bei Versuchsende. Es konnten keinerlei signifikante Gewichtsveränderungen zwischen den Behandlungsgruppen festgestellt werden. Gut zu erkennen ist jedoch die Involution, der physiologische Gewichtsverlust des Thymusgewebes, der mit der Alterung der Tiere einhergeht.

3.1.4 Serumparameter und EAO

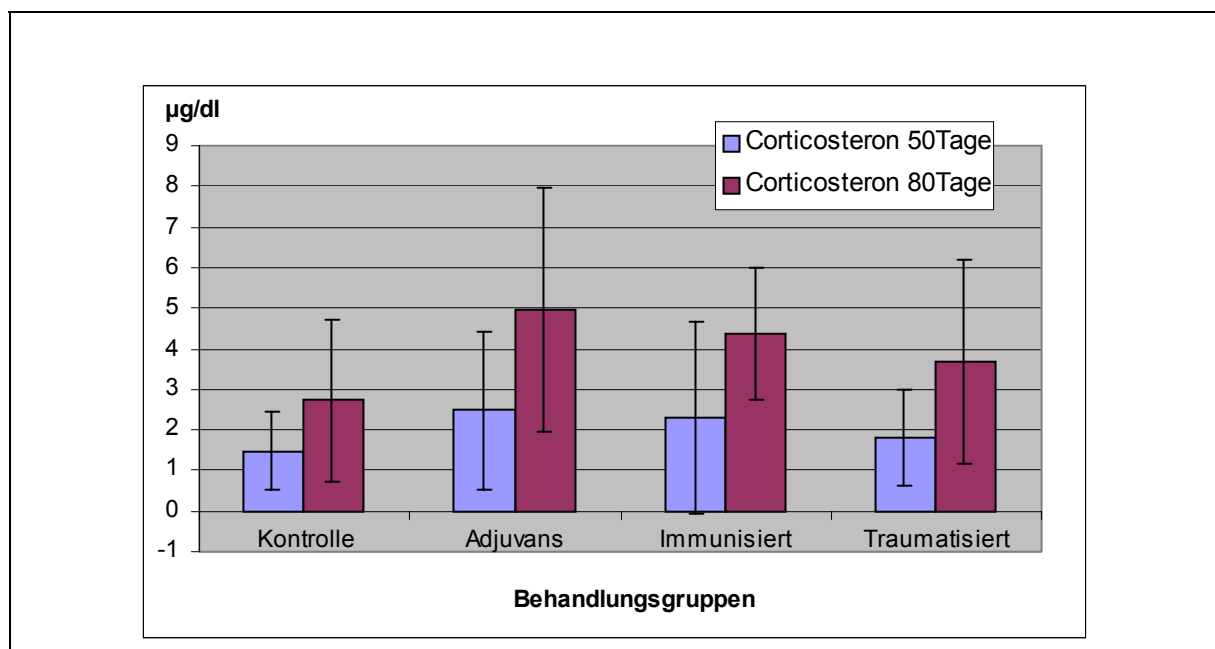
In Zusammenarbeit mit Dr. Adriana del Rey (Physiologisches Institut Marburg) wurden die Glucose-, Corticosteron- und Testosteronkonzentration im Serum mittels ELISA bestimmt.

Abbildung 11 : Serumglucose-Konzentration im Verlauf der EAO

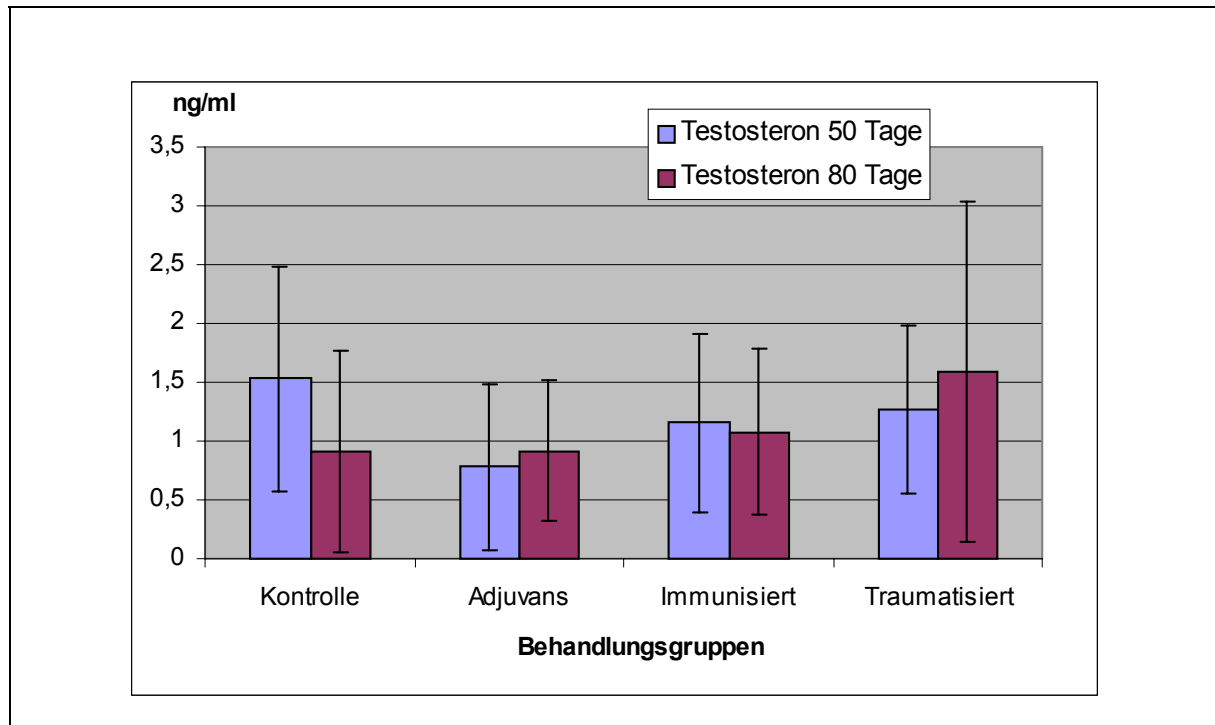


Gezeigt ist das Ergebniss der Serumglucose-Bestimmung der Versuchsreihe I. Auffallend, im Vergleich zu den anderen Serumparametern, ist die geringe Standardabweichung und die nahezu konstanten Serumglucosespiegel aller Tiere, unabhängig von Alter, bzw. Versuchsdauer, und Versuchsgruppenzugehörigkeit. Weder die Progression der EAO noch die Behandlungen der Tiere hatten Einfluß auf den Glucosespiegel der Tiere.

Abbildung 12 : Serumcorticosteron-Konzentration im Verlauf der EAO



In dieser Abbildung sind zusammenfassend dargestellt die Corticosteronwerte der Versuchsreihe I. Auffallend sind hier die hohen Standardabweichungen innerhalb der Gruppen. Selbst die unbehandelten Kontrolltiere zeigten starke Schwankungen der Corticosteronwerte im Serum. Auf Grund dieser hohen Standardabweichungen können keine Signifikanzen errechnet werden.

Abbildung 13 : Serumtestosteron-Konzentration in der EAO

Serumtestosteron-Konzentration der Versuchstiere der Versuchsreihe I. Auch bei diesen Werten war die Standardabweichung so groß, daß signifikante Änderungen der einzelnen Gruppen nicht errechnet werden konnten. Der Trend läßt jedoch eine leichte Verringerung der Serumtestosteronwerte in den Gruppen der mit Hodenhomogenat und Adjuvans behandelten Tiere vermuten.

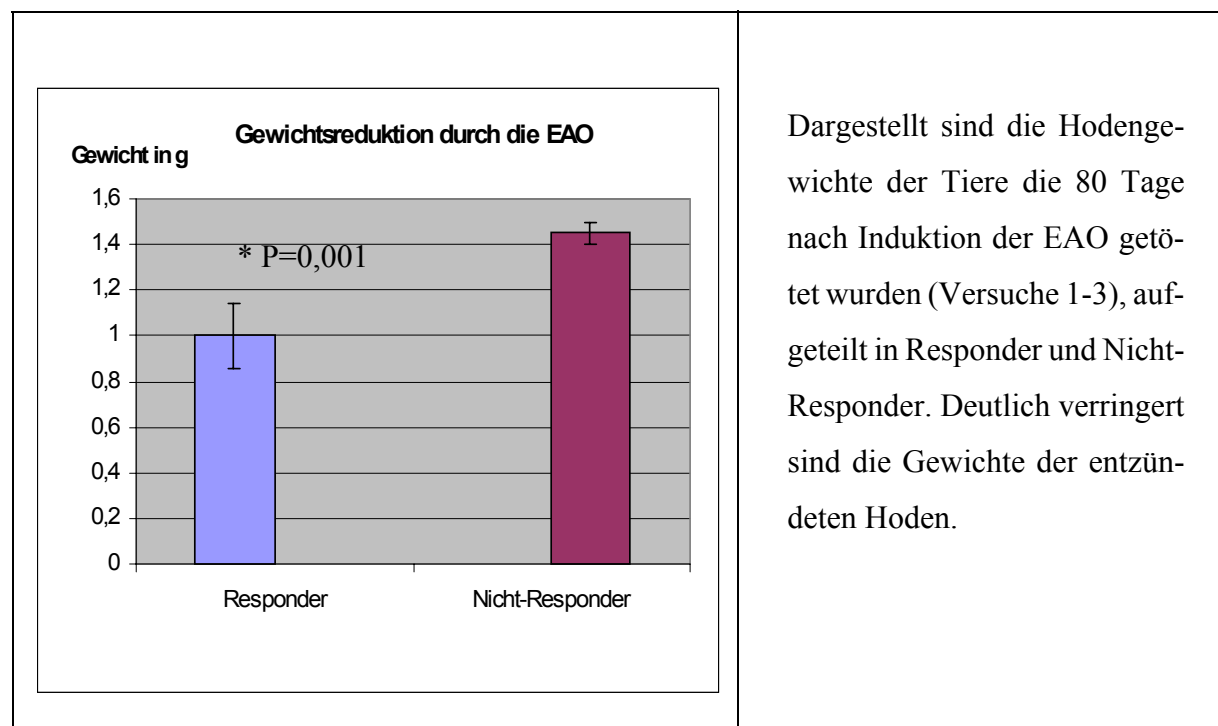
Zusammenfassend läßt sich für die Versuchsreihe 1 keine signifikante Veränderung der Serumparameter Glucose, Corticosteron und Testosteron in der EAO-Entwicklung feststellen.

3.2 Auswirkungen der EAO auf den Rattenhoden

Beim Rattenhoden wurden zunächst die Gewichte ermittelt und der makroskopische Eindruck protokolliert, um mögliche Veränderungen mit späteren mikroskopischen Ergebnissen zu vergleichen. Neben den augenscheinlichen Größenunterschieden einiger Hoden wiesen diese auch eine starke bläuliche Verfärbung auf.

Auf Grund der geringen Induktionseffizienz in Versuchsreihe 1, bei der die EAO mit Hodenhomogenat und GERBU-Adjuvant 100 ausgelöst werden sollte, wurden die Tiere aller Versuchsreihen für diese Untersuchung zusammengefasst. Die HH-Gruppe wurde dazu in Responder und Nichtresponder aufgeteilt, wobei die Einteilung nach der mikroskopischen Beurteilung Hämatoxilin-Eosin (HE) gefärbter Gewebeschnitte (siehe auch 3.3.2) erfolgte. Hier wurden beträchtliche Gewichtsreduktionen bei den entzündeten Hoden (Responder) beobachtet.

Abbildung 14: Statistische Bewertung des Hodengewichtes von Respondern und Nichtrespondern

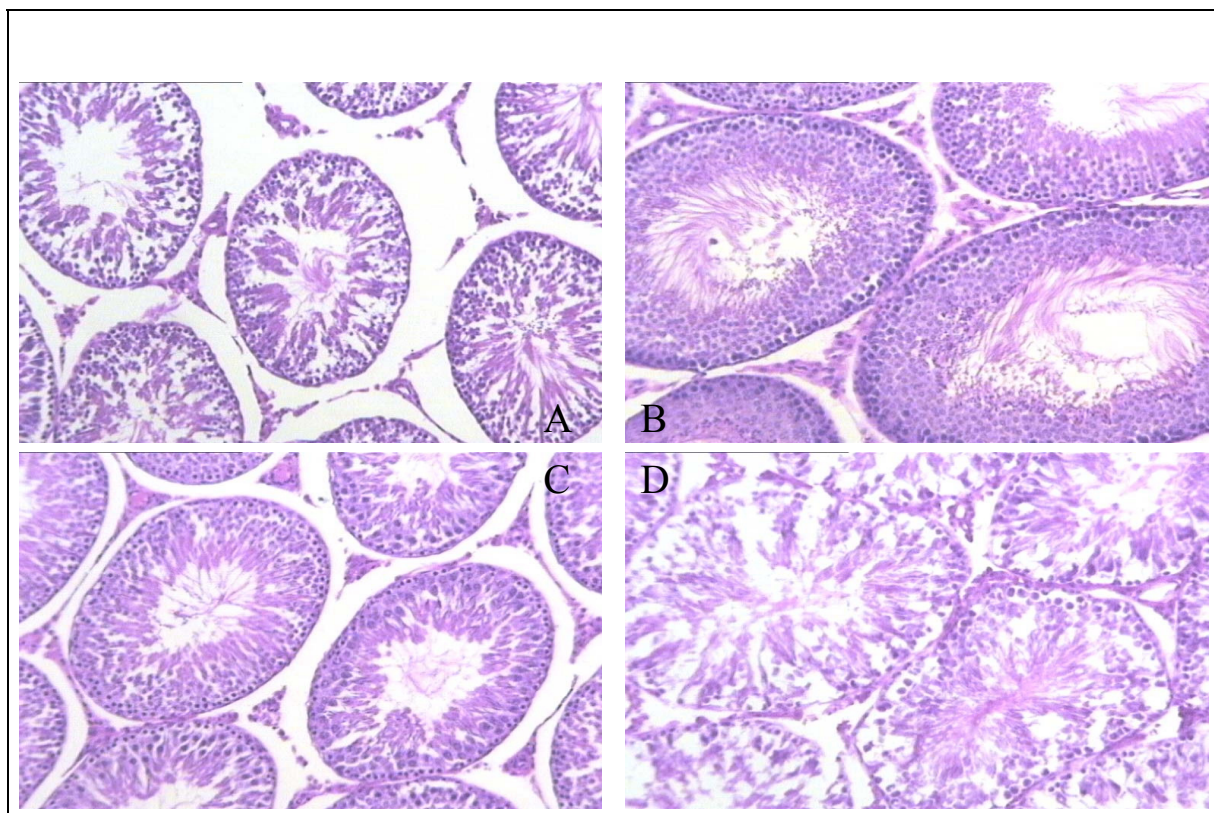


3.3 Morphologische Ergebnisse

3.3.1 Optimierung der Gewebefixation

Im Vorversuch sollte die geeignete Fixierung für das sehr empfindliche Hodengewebe ermittelt werden. Hierzu wurden die Tiere wie unter 2.2.1.6 zur Organentnahme vorbereitet und die Hoden fixiert und eingebettet (2.2.2.3 und 2.2.2.4) bzw. kryokonserviert (2.2.2.1). Zur Präparatherstellung wurden die Gewebe geschnitten (2.2.2.4 und 2.2.2.2) und HE gefärbt (2.2.2.7). Die Beurteilung der Präparate erfolgte per Durchlichtmikroskopie.

Abbildung 15: Mikroskopische Aufnahmen von Hodenpräparaten mit unterschiedlichen Fixierungen



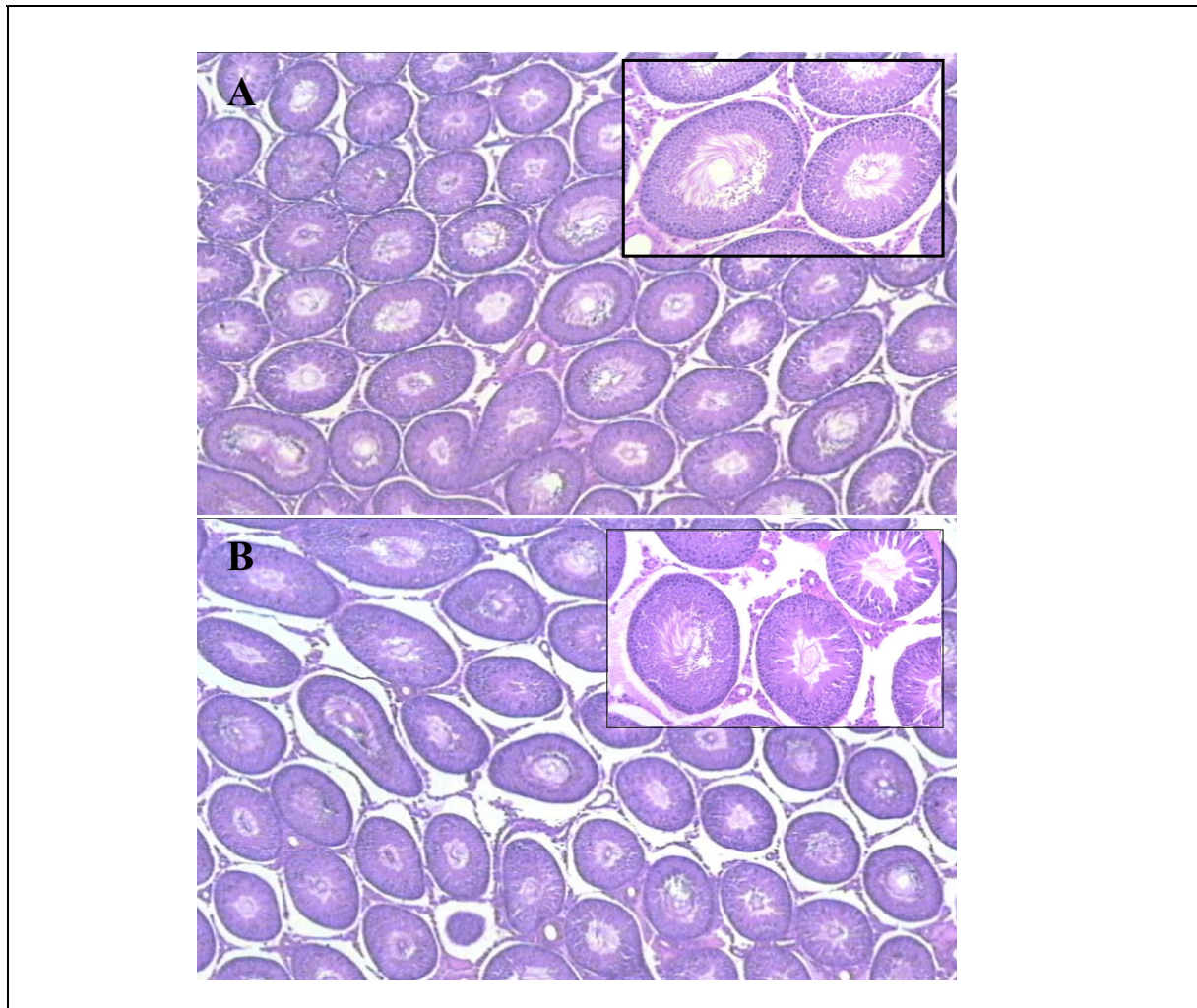
Die unterschiedliche Gewebeerhaltung der eingesetzten Fixierungen ist gut erkennbar. A) Formol fixierter Hoden. Auffällig sind die großen Zwischenräume im Interstitium, die auf eine starke Schrumpfung des Gewebes zurückzuführen sind. B) Bouin fixierter Hoden, die Gewebeerhaltung ist besser. C) Mit alkoholischem Bouin (Dubosqu Brasil) fixierter Hoden. Auch hier ist die Strukturhaltung gut. D) Mit Paraformaldehyd kryofixiertes Gewebe. Die Gewebestruktur ist sehr schlecht.

Auf Grund der besseren Strukturhaltung wurden die Gewebe für die nächsten Versuche mit Formol und Bouin fixiert.

3.3.2 Evaluation und Definition der EAO-Responder mittels HE-Färbung und Durchlichtmikroskopie

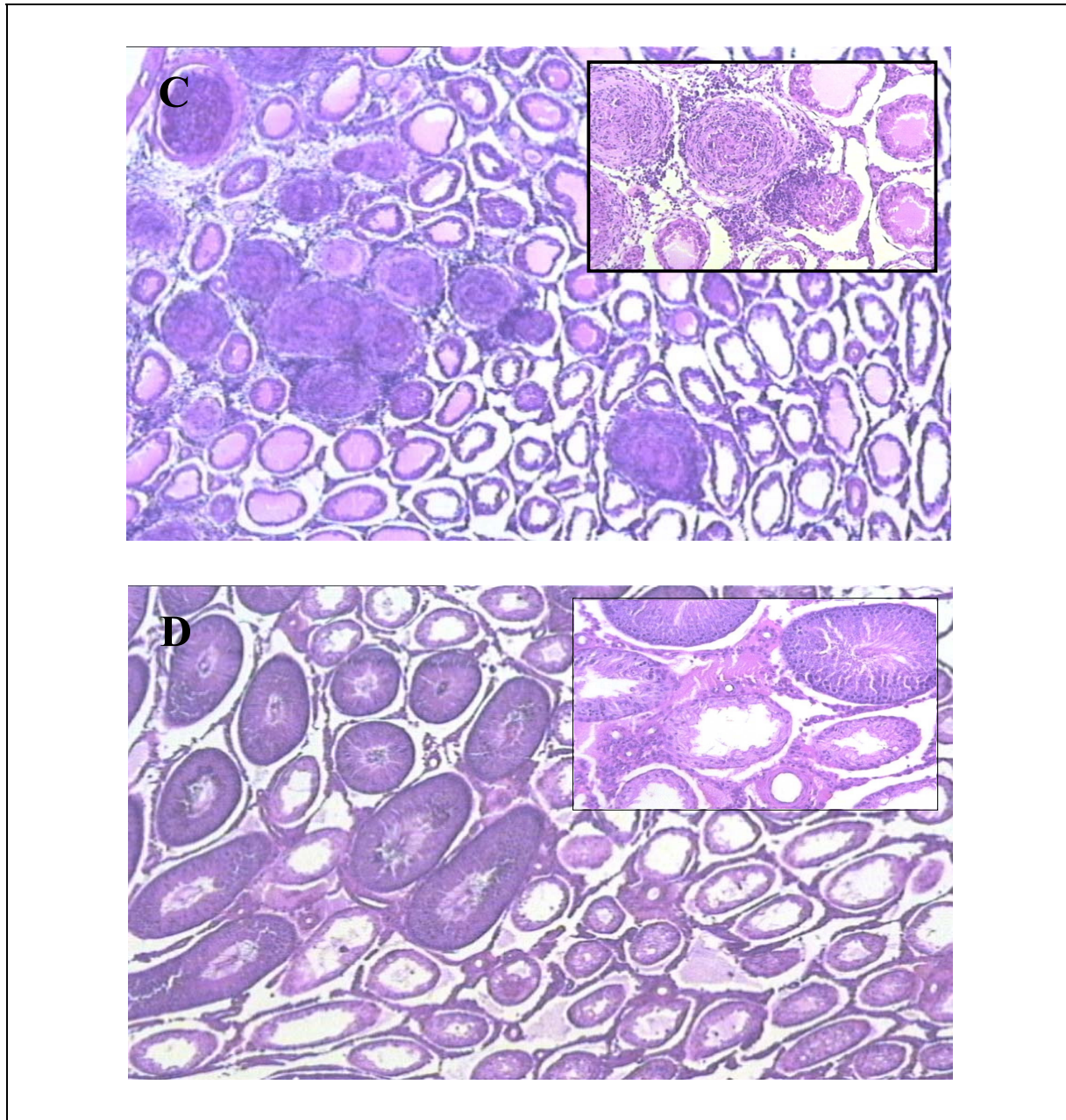
Um die Orchitiden zu selektieren, wurden zunächst die bouinfixierten Hoden aus dem Vorversuch mit HE gefärbt. Responder zeigten deutlich erkennbare Zellinfiltrationen und / oder geschädigte, bzw. leere Tubuli ohne Keimzellen.

Abbildung 16: Evaluation der Hoden der Kontrolltiere und der Nichtresponder-Gruppe (Versuchsreihe I)



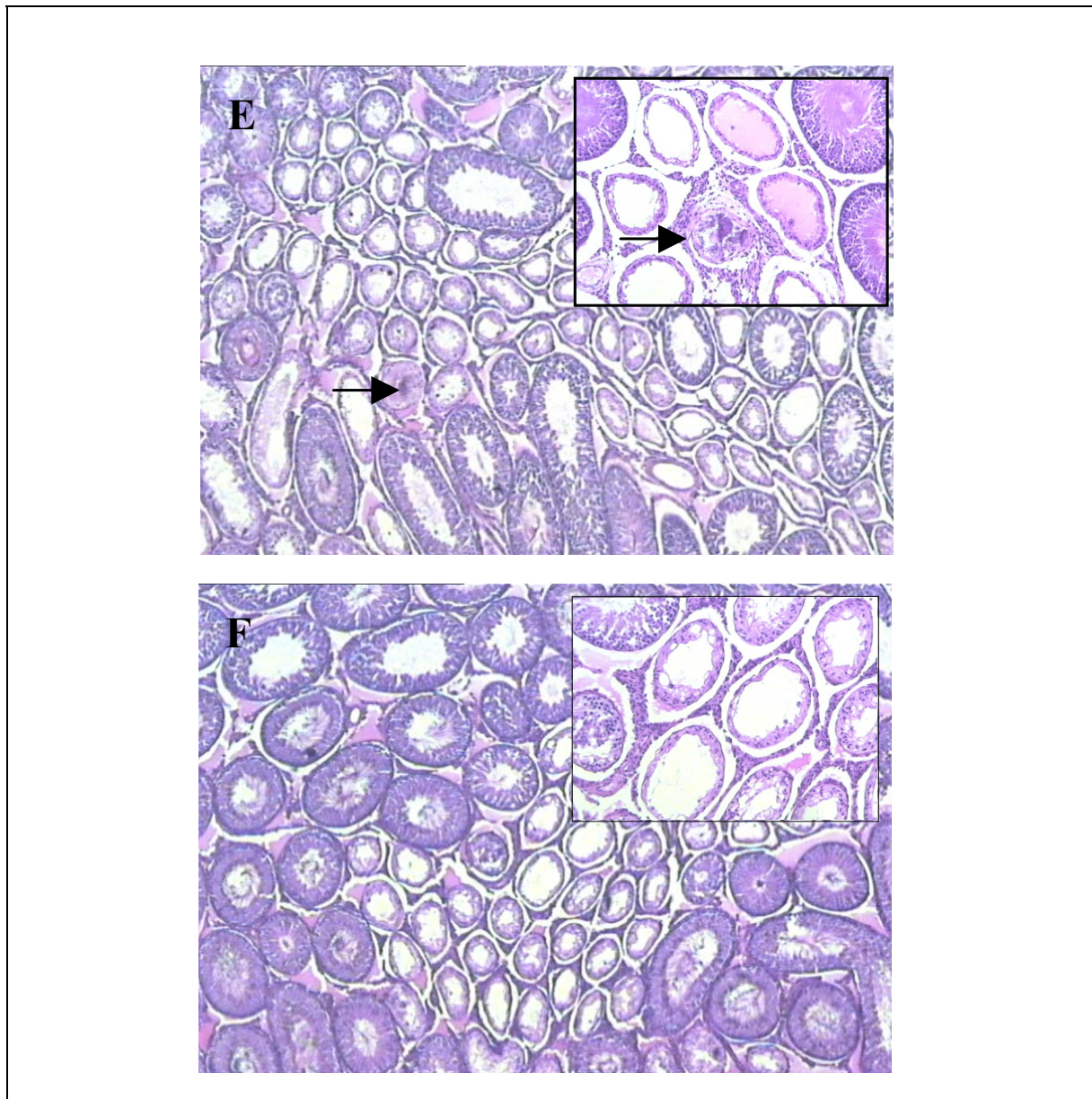
A) Gewebeschnitt eines Kontrollhodens (Bouin, HE).

B) Hoden eines Nichtresponders aus der Gruppe der immunisierten Tiere (Bouin, HE). Trotz der Behandlung (Immunisierung) lassen sich weder makroskopische noch mikroskopische Veränderungen der Hodenstrukturen gegenüber der Kontrolle erkennen.

Abbildung 17: Evaluation der EAO-Hoden (Versuchsreihe I)

C) Hoden eines Respondertieres (Bouin, HE): Gut zu erkennen sind die starken Zellinfiltrationen und Tubulusdegenerationen, die die physiologische Hodenstruktur völlig auflösen. D) Bouin fixierter und HE gefärbter Responderhoden mit degenerierten Tubuli ohne Vorkommen von Granulomen. Beide Formen wurden als Responder zusammengefasst und im weiteren nicht weiter unterschieden.

Abbildung 18: Evaluation der EAO-Hoden der Gruppe der traumatisierten Hoden (Versuchsreihe 1)



E) Gewebeschnitt eines primär traumatisierten rechten Hodens (Bouin, HE). Mit Pfeilen sind die Stichkanäle der Traumatisierung gekennzeichnet, die von degenerierten Tubuli umgeben sind. Auffällig bei dieser Art der Hodenentzündung ist die fokale Degeneration um die jeweiligen Stichkanäle der Traumatisierung. In weiter entfernten Arealen der Hoden ist die normale Hodenphysiologie erhalten. F) Mikroskopisches Präparat eines nicht traumatisierten Hodens (Bouin, HE). Gezeigt ist ein Responderhoden mit sympathischer Übertragung der Hodenentzündung auf den kontralateralen, primär nicht traumatisierten Hoden. Nichtresponder aus dieser Gruppe, d.h. Tiere, die keinen kontralateralen sympathischen Effekt zeigten, wiesen eine unauffällige Hodenmorphologie auf und werden hier nicht gezeigt.

3.3.3 Induktionseffizienzen der verschiedenen Immunisierungsprotokolle

Alle entnommenen Hoden wurden wie unter 2.2.2.1 , 2.2.2.3 und 2.2.2.4 beschrieben vorbereitet und wie unter 3.3.2 beschrieben in Responder und Nicht-Responder eingeteilt. Die einzelnen Versuche ergaben folgende Induktionseffizienzen der EAO.

Tabelle 9: Induktionseffizienz des Vorversuchs

Behandlung/ Rattenstamm	Hoden	100 Tage
Kontrollen Wistar Auszucht	R	0%
	L	0%
Hodenhomogenat Wistar Auszucht	R	75%
	L	75%
Traumatisiert Wistar Auszucht	R*	100%
	L**	50%

* primär traumatisierte Hoden; ** kontralaterale nicht-traumatisierte Hoden

Auf Grund dieser Ergebnisse wurden die gleichen Immunisierungsprotokolle für den Versuch Nr.1 gewählt. Da jedoch Inzucht-Tiere für die Untersuchung von Autoimmun-Erkrankungen zu bevorzugen sind und nur hier syngenes Material gewonnen werden kann, wurden solche Ratten für die Folgeversuche ausgewählt.

Tabelle 10: Induktionseffizienzen des Versuches Nr. 1

Behandlung/ Rattenstamm	Hoden	50 Tage	80 Tage
Kontrollen Wistar Kyoto Inzucht	R	0%	25%
	L	0%	0%
Adjuvans Wistar Kyoto Inzucht	R	0%	0%
	L	0%	0%
Hodenhomogenat Wistar Kyoto Inzucht	R	0%	25%
	L	25%	25%
Traumatisiert Wistar Kyoto Inzucht	R*	100%	100%
	L**	0%	25%

* primär traumatisierte Hoden; ** kontralaterale nicht-traumatisierter Hoden

Entgegen der Erwartung waren im Versuch Nr.1 die Induktionseffizienzen in der Hodenhomogenat-Gruppe wesentlich geringer als im Vorversuch. Um die Induktionseffizienz zu erhöhen, wurden die injizierten Hodenhomogenatmengen erhöht (siehe auch 2.2.1.3). Auch die Übertra-

gung der EAO vom ipsi- auf den kontralateralen Hoden in der Traumatisierten-Gruppe zeigte niedrigere Übertragungsraten, eine Erhöhung der Anzahl der Traumatisierungstiche sollte hier eine bessere Krankheitsinduktion zeigen.

Tabelle 11: Induktionseffizienz bei Versuch Nr. 2

Behandlung/ Rattenstamm	Hoden	50 Tage	80 Tage
Kontrollen Wistar Kyoto Inzucht	R	0%	0%
	L	0%	0%
Adjuvans Wistar Kyoto Inzucht	R	0%	0%
	L	0%	0%
Hodenhomogenat Wistar Kyoto Inzucht	R	12,5%	0%
	L	12,5%	0%
Traumatisiert Wistar Kyoto Inzucht	R*	37,5%	37,5%
	L**	0%	0%

* primär traumatisierte Hoden; ** kontralaterale nicht-traumatisierte Hoden

Die Erhöhung der injizierten Hodenhomogenatmengen brachte nicht die gewünschte Erhöhung der Induktionseffizienz. Aus diesem Grund wurde das gesamte Immunisierungsprotokoll überarbeitet und nicht nur das Injektionsmuster, sondern auch die Adjuvansien verändert. Die Injektionslösungen wurden nun nicht mehr wie zuvor s.c. in die Inguinalregion, sondern s.c. in die hinteren Fußsohlen und an vier Stellen gangliennah im Rücken injiziert. Zusätzlich zu dem GERBU Adjuvant 100 wurden Mycobakterium tuberculosis und Bordetella pertussis zur EAO-Induktion eingesetzt (siehe auch 2.2.1.3 und 2.2.1.4).

Tabelle 12: Induktionseffizienz und Fußsohlenreaktionen (FSR) bei Versuch Nr. 3

Behandlung/ Rattenstamm	Hoden	25 Tage	35 Tage	50 Tage	80 Tage
Hodenhomogenat mit Toxin Lewis Inzucht	R	0%	0%	0%	0%
	L	0%	0%	25%	25%
	FSR	100%	100%	100%	100%
Hodenhomogenat mit Toxin Wistar Kyoto Inzucht	R	0%	0%	0%	100%
	L	0%	0%	75%	100%
	FSR	100%	100%	100%	100%

Tabelle 12: Induktionseffizienz und Fußsohlenreaktionen (FSR) bei Versuch Nr. 3

Behandlung/ Rattenstamm	Hoden	25 Tage	35 Tage	50 Tage	80 Tage
Hodenhomogenat ohne Toxin Lewis Inzucht	R	0%	0%	0%	0%
	L	25%	0%	0%	0%
	FSR	0%	0%	0%	0%
Hodenhomogenat ohne Toxin Wistar Kyoto Inzucht	R	0%	0%	0%	75%
	L	25%	0%	0%	75%
	FSR	0%	50%	25%	0%

Die ohne Toxin ausgelösten FSR waren wesentlich schwächer ausgeprägt als die mit Toxin ausgelösten Reaktionen.

Tabelle 13: Kontrollversuch zu Versuch Nr. 3

Behandlung/ Rattenstamm	Hoden	25 Tage	35 Tage	50 Tage	80 Tage
Adjuvans mit Toxin Lewis Inzucht	R	0%	0%	0%	0%
	L	0%	0%	0%	0%
	FSR	25%	50%	100%	100%
Adjuvans mit Toxin Wistar Kyoto Inzucht	R	0%	0%	0%	0%
	L	0%	0%	0%	0%
	FSR	0%	100%	100%	100%
Adjuvans ohne Toxin Lewis Inzucht	R	0%	0%	0%	0%
	L	0%	0%	0%	0%
	FSR	0%	0%	0%	0%
Adjuvans ohne Toxin Wistar Kyoto Inzucht	R	0%	0%	siehe Tabelle 11:	siehe Tabelle 11:
	L	0%	0%		
	FSR	0%	0%		

Mit zunehmender Versuchsdauer nimmt der Anteil der Respondertiere zu. Dies gilt sowohl für die Immunisierungsvariante, als auch für die Stichtraumatisierung des Hodens und die Entwicklung einer EAO im kontralateralen Hoden. Der Vergleich verschiedener Rattenstämme zeigt, dass jeder Stamm unterschiedlich auf die Behandlungen reagiert, was auf eine genetische Prädisposition schließen lässt. Wistar-Auszucht-Ratten scheinen besser mit einem sympathischen Effekt, d.h. die Entwicklung einer EAO im kontralateralen Hoden zu reagieren, als die Wistar-Inzucht-Tiere. Wistar-Inzucht-Ratten reagieren auf die Behandlung mit Hodenhomogenat stärker mit einer Hodenentzündung als Lewis Ratten.

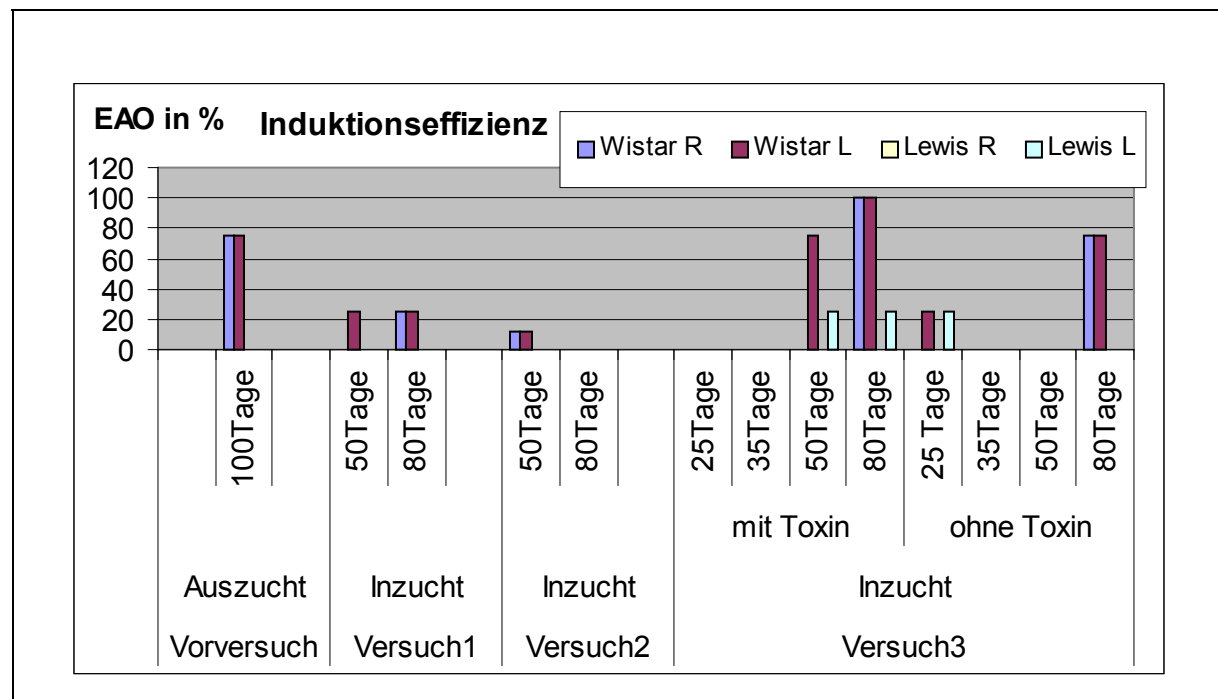
Wesentlich ist zudem die Art der Immunisierung und die injizierten Adjuvansien. Die Immunisierung an vier gangliennahen Regionen (subcutan) und die Injektionen in die hinteren Fuß-

sohlen steigert die Induktionseffizienz um 50-75%. Injiziert man zusätzlich zu dem Hodenhomogenat und dem Adjuvans (GERBU) *Mycobacterium tuberculosis* und *Bordetella Pertussis* wird die Induktionseffizienz um weitere ca. 25% verbessert.

Im Kontrollversuch entwickelte keines der Tiere eine EAO (2.2.1.4 und Tabelle 13:).

Zusammenfassend läßt sich sagen, daß der Wistar-Rattenstamm die höchste EAO-Induktionsrate aufwies. Die zusätzliche Applikation von *Mycobacterium tuberculosis* und *Bordetella pertussis* wirkte sich positiv auf die EAO-Entwicklung aus. Wichtig bei allen Immunisierungsarten ist die Versuchszeit. Um eine ausreichend hohe EAO-Induktionsrate zu erhalten, sind mindestens 80 Tage, besser mehr, als Versuchszeit anzusetzen. Für die EAO-Entwicklung durch einen sympathischen Effekt, ist jedoch der Wistar-Auszucht-Rattenstamm den Inzucht Tieren vorzuziehen.

Abbildung 19: Induktionseffizienzen



Gezeigt sind die Induktionseffizienzen der verschiedenen Immunisierungsprotokolle. Augenscheinlich ist die gesteigerte Effizienz mit zunehmender Inkubationszeit. Bei gleichem Immunisierungsprotokoll haben die Auszucht-Ratten eine bessere Suszeptibilität für die EAO als die Inzucht Tiere. Die Modifizierung des Immunsierungsprotokolls führte jedoch auch bei den Inzucht-Ratten zu einer verbesserten Induktionseffizienz in den Gruppen mit längerer Inkubationszeit. (R und L = rechter und linker Hoden)

3.3.4 Delayed Type Hypersensitivity (DTH) und EAO

Durch die Injektion der Lösung 1 (2.2.1.3) in die hinteren Fußsohlen wurde zu 100% eine DTH, in dieser Arbeit als Fußsohlenreaktion (FSR) bezeichnet, ausgelöst (siehe auch Abbildung 7 und Tabelle 12:, sowie Tabelle 13:). Die FSR gibt einen Anhaltspunkt für die Sensibilisierung der Lymphocyten und deren Migration in das Gewebe (David, 1966).

Im Versuch Nr. 3 reagierten die Wistar Kyoto-Tiere zu 100% mit einer FSR und entwickelten nach 80 Tagen zu 100% eine EAO. Ebenfalls vollständig zeigten die Lewis-Ratten (Inzucht) eine FSR, diese entwickelten jedoch nach 80 Tagen nur zu 25% eine EAO.

Injektionen der Lösung 2 (ohne Mycobacterium tuberculosis) in die Fußsohlen und an 4 gangliennahe Punkte des Rückens führte bei den Lewis Ratten (Inzucht) zu keinerlei FSR oder EAO-Entwicklung, auch nicht nach 80 Tagen. Die Lösung 2 nach dem gleichen Verteilungsmuster in die Wistar Kyoto Ratten (Inzucht) injiziert, löst zunächst eine FSR aus. Nach 35 Tagen wiesen 50% und nach 50 Tagen 25% der Tiere eine FSR auf, die nach 80 Tagen bei allen Ratten wieder verschwunden war. 75% der so behandelten Tiere entwickelten aber nach 80 Tagen eine EAO (siehe auch Tabelle 12:).

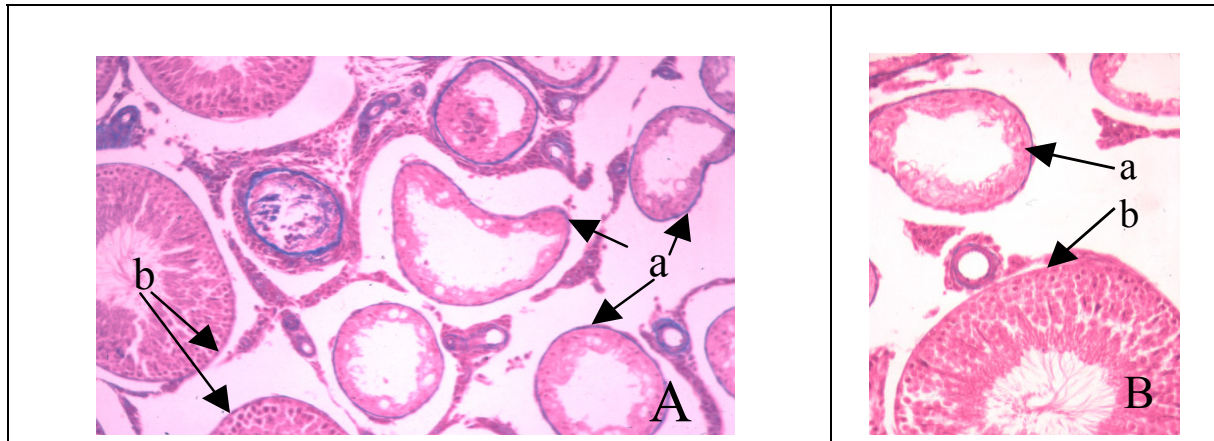
Im Kontrollversuch waren die FSRs ähnlich wie im Versuch Nr. 3. Ab dem 35. Tag zeigten die Wistar Kyoto Ratten, die mit Toxin behandelt wurden zu 100% eine FSR, während die Lewis Ratten mit der gleichen Behandlung diese Reaktion erst ab dem 50. Tag zeigten. Ohne Toxin war keine FSR zu induzieren (siehe auch Tabelle 13:).

Der Kontrollversuch und auch die Daten aus dem Versuch Nr. 3 zeigten klar, daß eine FSR nicht zwangsläufig mit einer positiven EAO-Entwicklung einhergeht, aber Reaktionsdispositionen bezüglich der T-Zell-Reaktivität der Rattenstämme aufzeigt. Als Marker zur Überprüfung für eine EAO zwecks Vermeidung einer histologischen Analyse ist diese Art der DTH jedoch nicht geeignet.

3.4 Morphologische Charakterisierung der EAO

3.4.1 Tubuluswandverdickungen bei der EAO

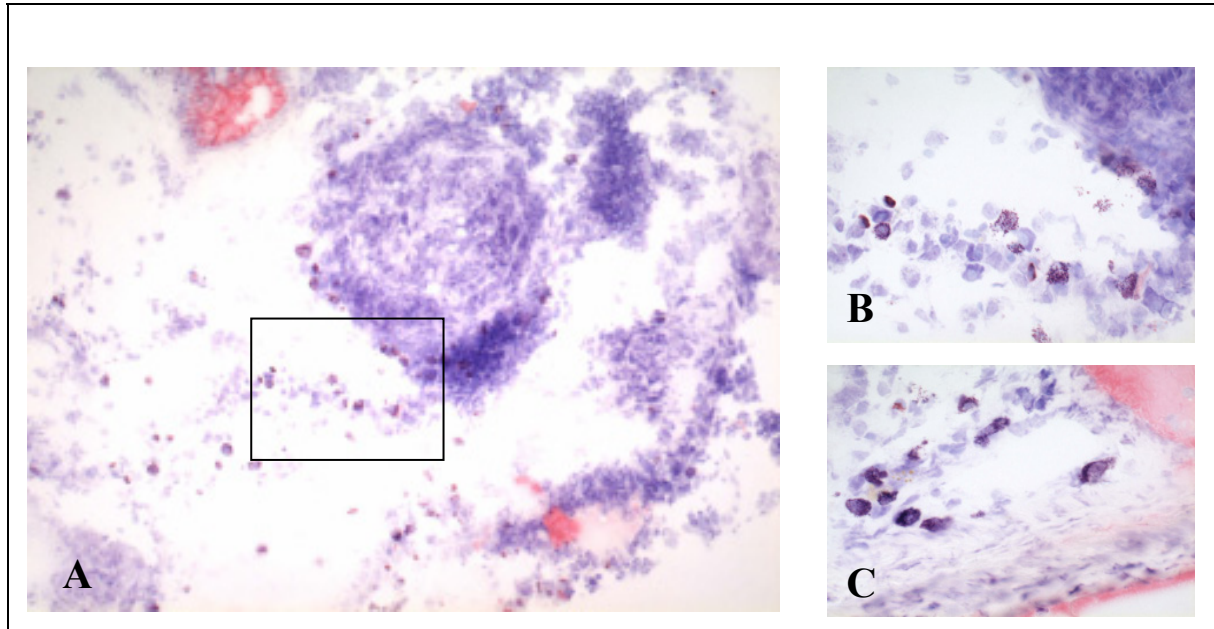
Abbildung 20: Tubuluswandverdickung



Gezeigt ist in beiden Abbildungen ein azangefärbter stichtraumatisierter Rattenhoden. Gut zu erkennen sind die blau gefärbten Kollagenfasern (Typ 3 und 4) der Basalmembran der Hodentubuli. Mit a gekennzeichnet stark verdickte Basalmembranen degenerierter Tubuli. Mit b gekennzeichnet die in physiologischem Zustand befindlichen dünneren Basalmembranen der unveränderten Tubuli. (A 10 x und B 40 x Vergrößerung).

3.4.2 Mastzellen in der EAO

Abbildung 21: Mastzell-Darstellung mittels Giemsa-Färbung

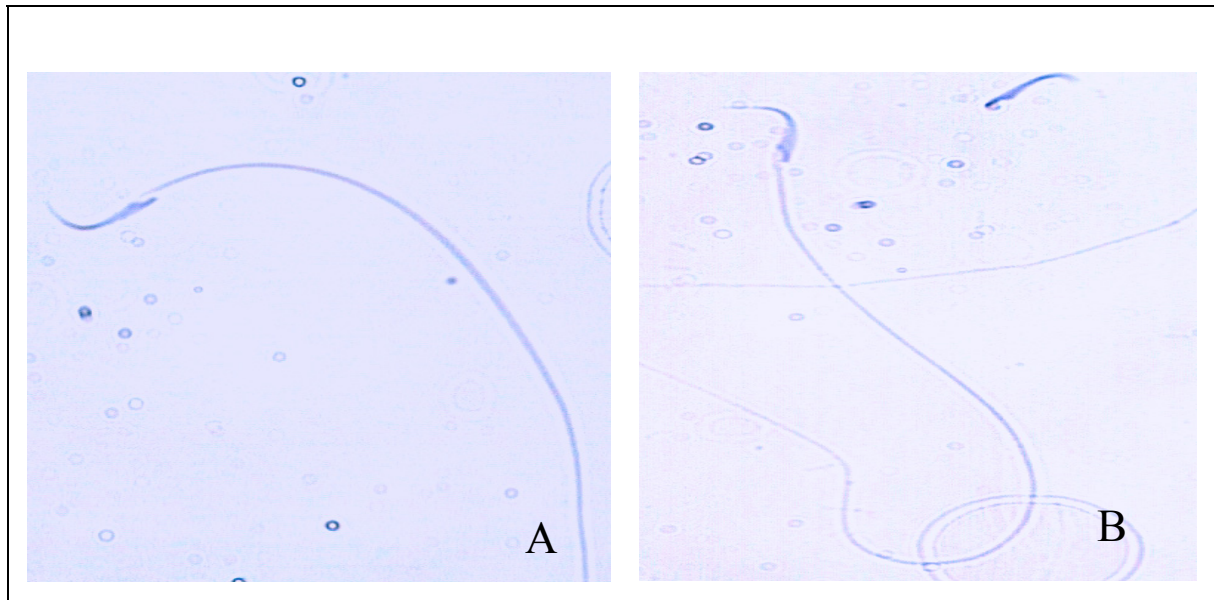


A) Übersichtsaufnahme eines EAO-Hodens mit granulomatösen Entzündungszentren. Gut zu erkennen sind die Mastzellgranula (violett) der durch die Giemsa-Färbung angefärbten Mastzellen. Diese Mastzellen lassen sich in den Entzündungszentren aller Responderhoden zeigen, vorwiegend paravaskulär und paragranulär. In der Abbildung B) Ausschnittsvergrößerung aus A (Rechteck). C) In den Nichtresponder- oder Kontrollhoden lassen sich diese Zellen nur subkapsulär und sehr vereinzelt in kleinen Clustern finden.

In den EAO-Responderhoden zeigte sich die Mastzellpopulation stark vermehrt.

3.4.3 Spermienmorphologie und EAO

Abbildung 22: Hämatoxilin-gefärbte Spermien von EAO- und Kontrolltieren



Hämatoxilin gefärbte Spermienausstriche eines Kontrolltieres (A) und einer immunisierten Ratte mit einem vereiterten Nebenhoden (B). Beide Spermien weisen eine unauffällige Morphologie auf.

Allen Tieren des Versuchs 2 wurden zusätzlich die Nebenhoden entnommen. Morphologische Veränderungen der Spermien konnten weder bei entzündeten Hoden, noch Immunisierung oder Traumatisierung, noch bei vereitertem Nebenhoden gezeigt werden. Diese Art der partiellen Orchitis bzw. Epididymitis, scheint keinen sekundären Einfluß auf die morphologische Integrität bereits entwickelter Spermien zu haben.

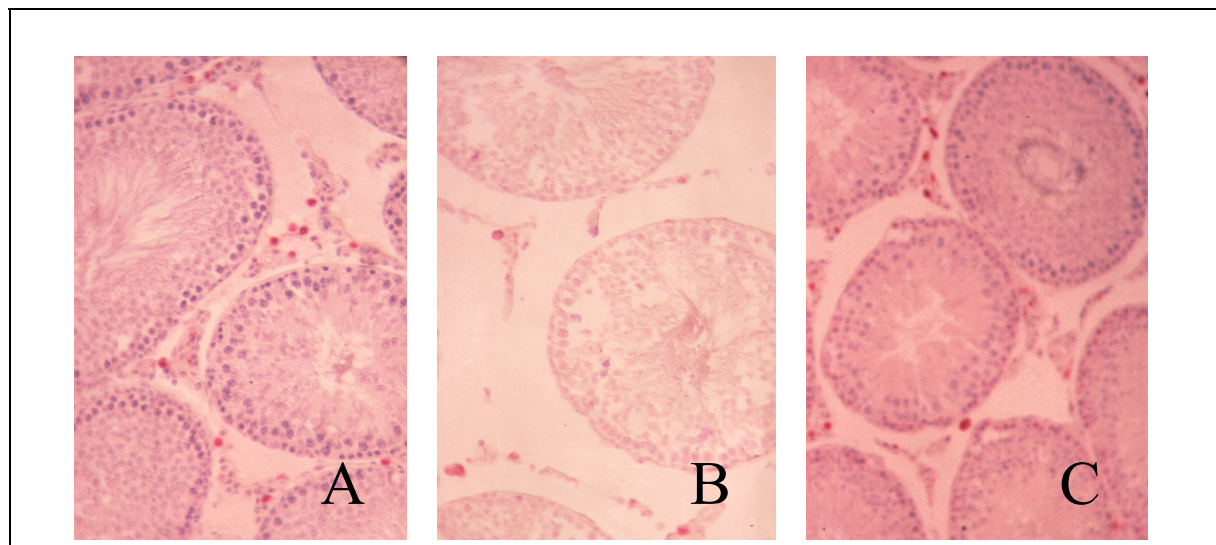
3.4.4 Immunhistochemische Nachweise

Im Rahmen der Untersuchungen der EAO sollten Immunzellmigration bzw. -proliferation im Hodengewebe mittels immunhistochemischer Nachweisverfahren untersucht werden. Dazu mußte zunächst eine für alle nachzuweisenden Antigene geeignete Protokollvariante etabliert werden. Dabei war die Balance zwischen Ag- und Strukturverlust entscheidend.

3.4.4.1 Immunhistochemischer Nachweis mittels Antigenfreilegungspuffer und Mikrowellenbehandlung

Alle unterschiedlich fixierten Gewebe wurden wie unter 2.2.2.8 beschrieben zur Antigenfreilegung behandelt und dem Antigennachweis unterzogen.

Abbildung 23: Darstellung der Hodenmakrophagen mit den anti-ED1 und anti-ED2 Antikörpern an unterschiedlich fixiertem Hodengewebe



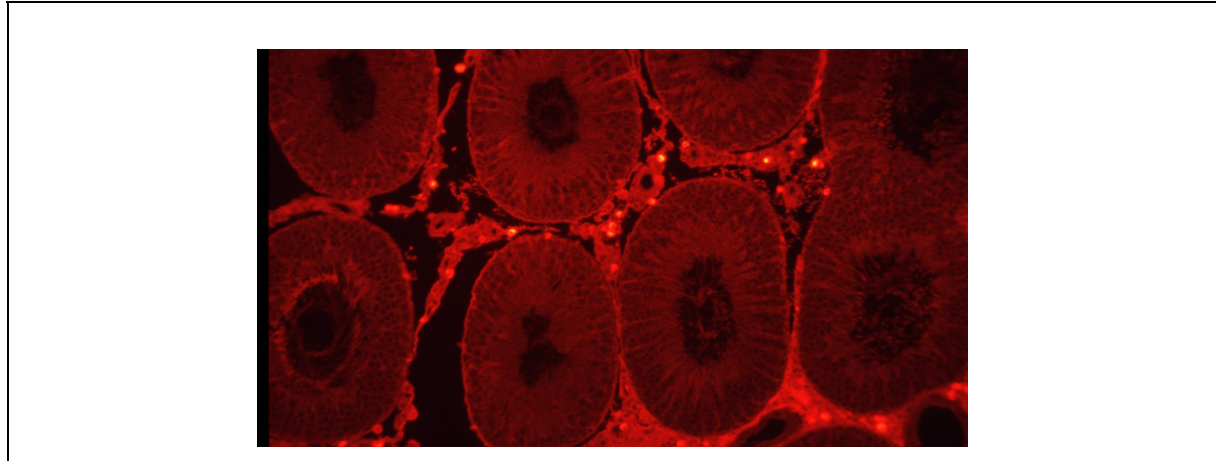
Gezeigt sind drei unterschiedlich fixierte Hodenschnitte (A: Bouin, B: Formol und C: Bouin alkoholisch). Die durch die Fixierungen und Paraffineinbettungen maskierten Antigene wurden mit einem Antigenfreilegungspuffer, und Mikrowellenbehandlung demaskiert und mit den Antikörpern gegen ED1(CD68) auf A und C und gegen ED2 auf B nachgewiesen. An allen unterschiedlich fixierten Geweben sind die Makrophagenantigene nachzuweisen. Gut zu erkennen ist die durch die Verwendung verschiedener Fixantien unterschiedlich gute Qualität der Geweberhaltung.

Mit Mikrowellenbehandlung konnten nur die Antigen determinanten ED1 und ED2 nachgewiesen werden. Kryokonserviertes und PFA-fixiertes Gewebe wurde durch diese Behandlungsweisen zu stark geschädigt, um anschließende quantitative Auswertungen daran vornehmen zu können. Antigenfreilegung mit Trypsin (0,0025% in PBS) oder Pepsin (0,4% in 0,01 N HCl), veränderte Blockierungslösungen mit BSA (5 % und 10%), Rotiblock (1x), FKS (10%) und Ziegenserum (10%) bzw. veränderte Waschprotokolle brachten nicht die gewünschten Färbeargebnisse. Auch unterschiedliche Methoden zur Abreaktion der endogenen Peroxidasen H_2O_2 (3% in A.dest alternativ in Methanol) konnten die Färbeargebnisse nicht verbessern.

3.4.4.2 Immunfluoreszenzen

Ein weiterer Versuch zum Antigennachweis der Immunzellen war die Methode der Immunfluoreszenz.

Abbildung 24: Antigennachweis mittels Immunfluoreszenz



Gezeigt ist eine Immunfluoreszenz ED1-positiver testikulärer Makrophagen.

Mittels Immunfluoreszenz konnten wiederum nur die für ED1- und ED2-positiven Hoden-Makrophagen nachgewiesen werden. Es war jedoch ein stärkerer Hintergrund zu erkennen, als mit der unter 3.4.4.1 beschriebenen Methode, der am stärksten bei kryokonserviertem Gewebe war. Die fixations-empfindlichen T-Zell-Antigene konnten mit den bis hier beschriebenen Methoden nicht nachgewiesen werden.

3.4.4.3 Immunhistochemischer Nachweis von Immunzellpopulationen an kryokonserviertem Gewebe mit Hilfe der ABC-Methode

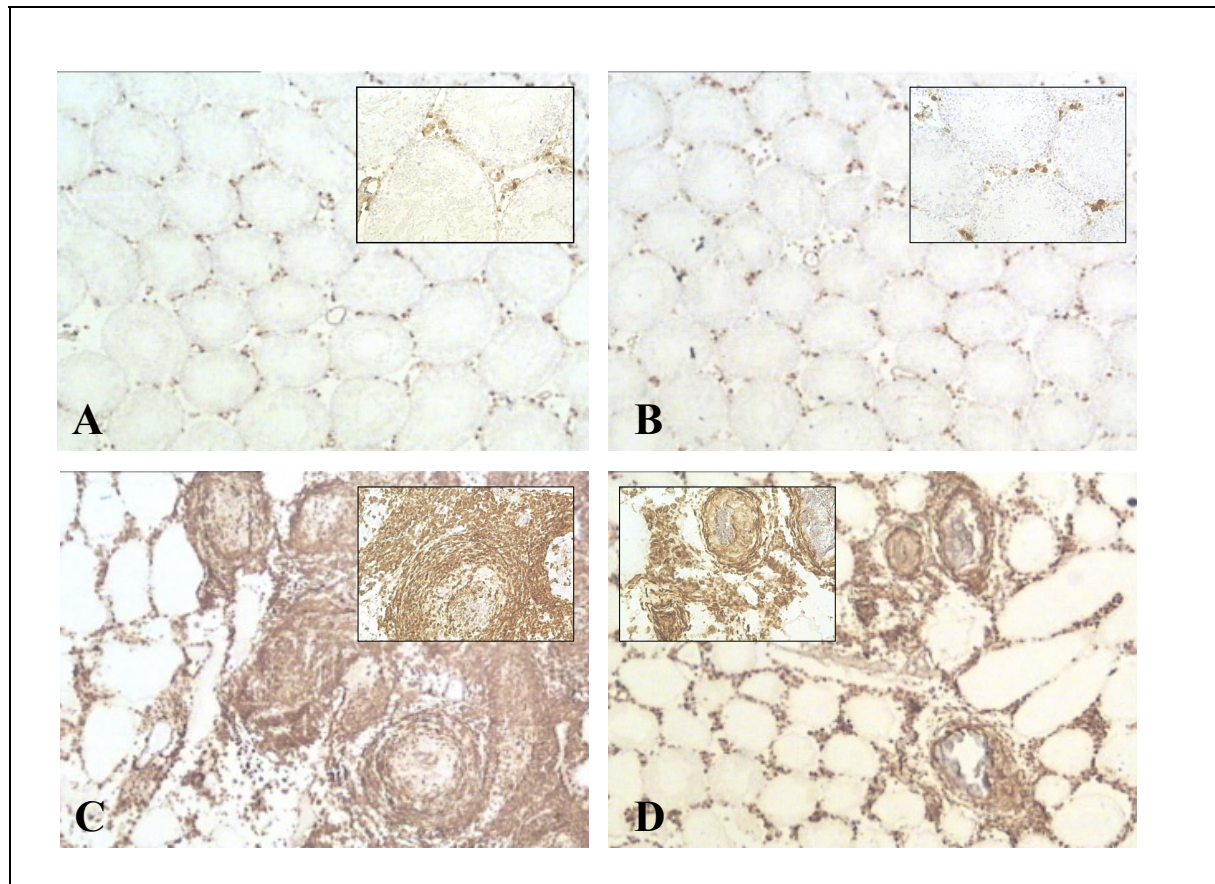
Nur die ED1- und ED2- Antigene der Makrophagen-Populationen im Hoden konnten an fixiertem Gewebe nachgewiesen werden. Alle anderen zu untersuchenden Ag (siehe Tabelle 4:) konnten nur an kryokonserviertem Gewebe, welches kurz vor dem Nachweis für lediglich 10 min bei 4°C mit Isopropanol fixiert wurde, nachgewiesen werden.

Um die quantitative Auswertung aller Immunzellpopulationen miteinander vergleichbar zu machen, wurden alle immunhistochemischen Nachweise, die zur Quantifizierung bestimmt waren, an kryokonserviertem Gewebe vorgenommen. Dies war wichtig, da die Gewebe (Abbildung 15:) je nach Fixierung unterschiedlich stark schrumpfen und bei der Quantifizierung die Zellzahlen auf die ausgezählte Fläche bezogen werden.

Trotz nur moderater Gewebestrukturerhaltung wurden die immunhistochemischen Nachweise aus den oben beschriebenen Gründen an kryokonservierten Hoden durchgeführt.

Von allen Tieren des Versuchs 1 wurden von beiden Hoden (siehe 2.2.2.1 und 2.2.2.2) Gewebeschnitte hergestellt und wie unter 2.2.2.8C beschrieben immunhistochemisch untersucht. Nachgewiesen wurden die folgenden Zellpopulationen: zirkulierende Makrophagen, residente Makrophagen, T-Zellen, CD4-positive Zellen, CD8-positive Zellen, Dendritische Zellen, aktivierte T-Zellen und proliferierende Zellen (siehe Tabelle 4:).

Von den unbehandelten Kontrolltieren und den nur mit Adjuvans behandelten Tieren wurden jeweils die rechten Hoden, von den immunisierten und den traumatisierten Ratten beide Hoden quantifiziert.

Abbildung 25: CD4(+)-Zellen in der EAO / Immunhistochemischer Nachweis

Immunhistochemischer Nachweis von CD4(+)-Zellen in den Hoden der verschiedenen Behandlungsgruppen. Eine positive Immunreaktion für CD4 findet sich in T-Helferzellen, Thymocyten und Makrophagen.

A) Kontrollhoden: Die CD4(+)-Zellen sind gleichmäßig im Interstitium verteilt.

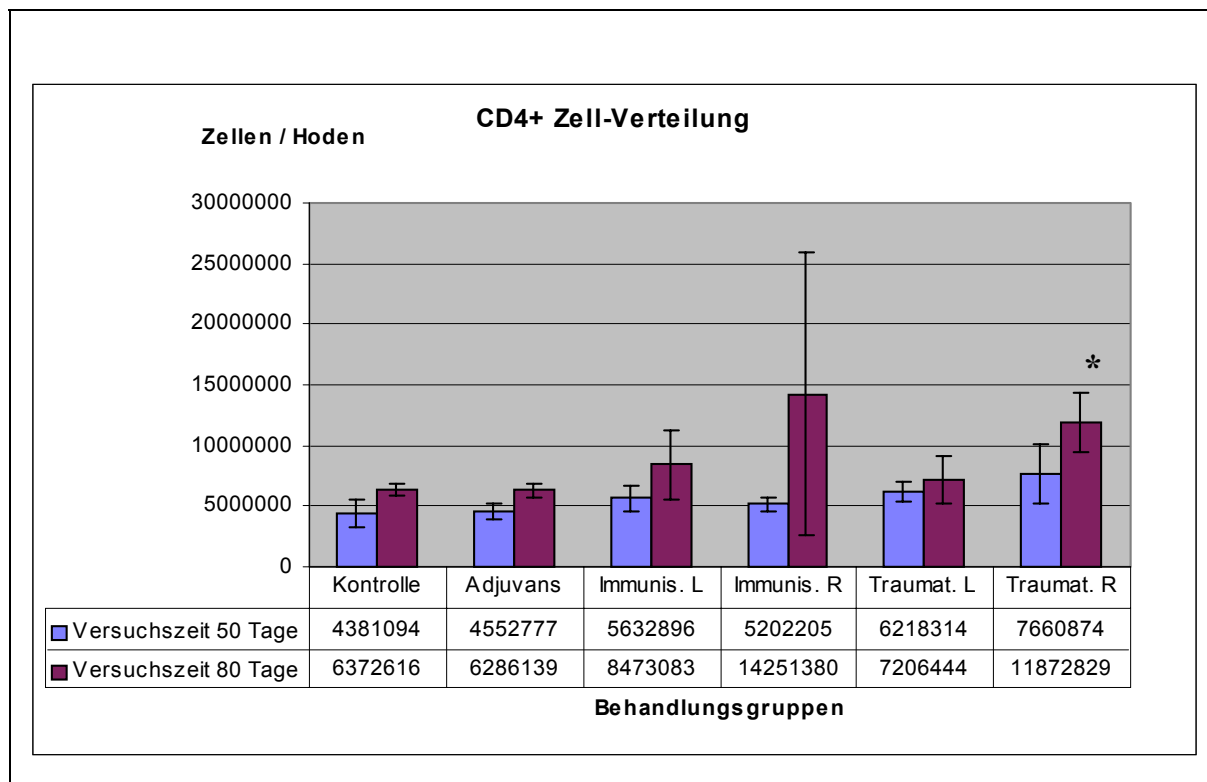
B) Adjuvans Behandlung: Es findet sich die gleiche Verteilung der CD4(+)-Zellen wie in dem Kontrollhoden.

C) Responderhoden einer immunisierten Ratte: Die Granulome sind stark mit CD4(+)-Zellen durchsetzt. Auffällig ist die Konzentration der Zellen um Zentren, die von Zellen und Zelltrümmern gebildet zu sein scheinen. Die umgebenden Tubuli enthalten keine für die Spermatogenese typischen Zellen.

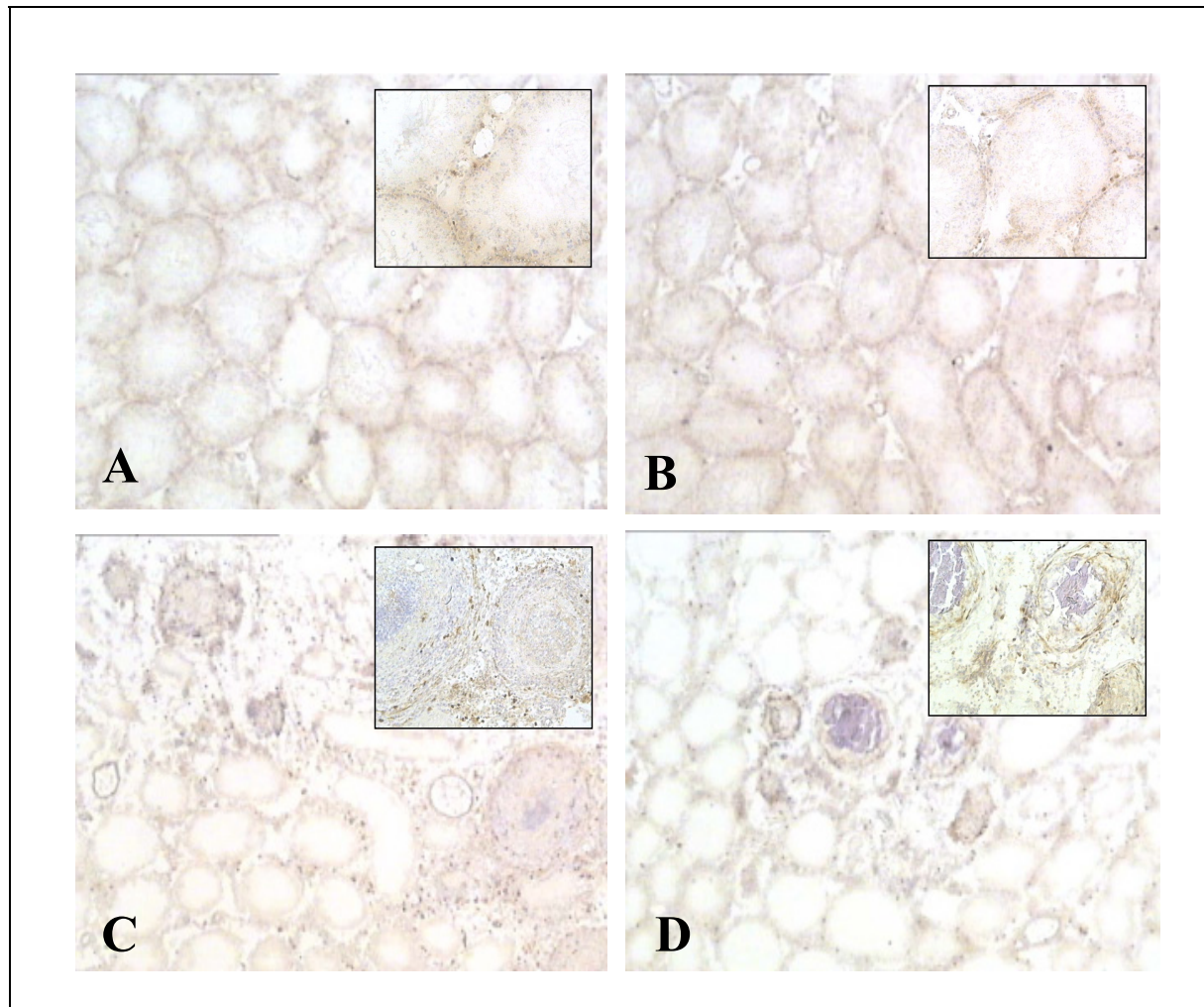
D) Stichkanal eines traumatisierten Hodens, der von Entzündungszentren mit stark CD4(+)-Zellen umringt ist. Die umgebenden Tubuli zeigen keine spermatogenese-typischen Zellen. Weiter entfernt eine weitgehend normale Hodenstruktur mit leicht erhöhten CD4(+)-Zellen, die mit zunehmender Entfernung vom Stichkanal Kontrollwerte annimmt.

Sämtliche immunpositiven Zellen sind ausschließlich im Interstitium fokussiert.

Nichtresponderhoden aus der Gruppe der immunisierten Tiere und kontralaterale Hoden aus der Gruppe der traumatisierten Tiere zeigten keinerlei Unterschiede zu den Kontrollhoden der unbehandelten Tiere (nicht gezeigt).

Abbildung 26: CD4(+)-Zellen in der EAO / Statistische Auswertung

Graphische Darstellung der quantifizierten CD4(+)-Zellen der einzelnen Behandlungsgruppen. Signifikant erhöht ist diese Zellpopulation in der Gruppe der primär traumatisierten Hoden (*). Hier ist eine Zunahme der Zellzahlen von ca. 75% (50 Tage) und 85% (80 Tage nach Behandlung) zu erkennen. Auffallend ist auch, daß die CD4(+)-Zellen während der Versuchszeit um ca. 45% akkumulierten.

Abbildung 27: CD8(+)-Zellen / Immunhistochemischer Nachweis

Immunhistochemischer Nachweis von CD8(+)-Zellen in den Hoden der verschiedenen Behandlungsgruppen. Eine positive Immunreaktion für CD8 findet sich in einer Subpopulation der T-Zellen, den meisten Thymocyten und dem überwiegenden Teil der Natural-Killer-Zellen (NK-Zellen).

A) Kontrollhoden: Die CD8(+)-Zellen sind gleichmäßig im Interstitium verteilt .

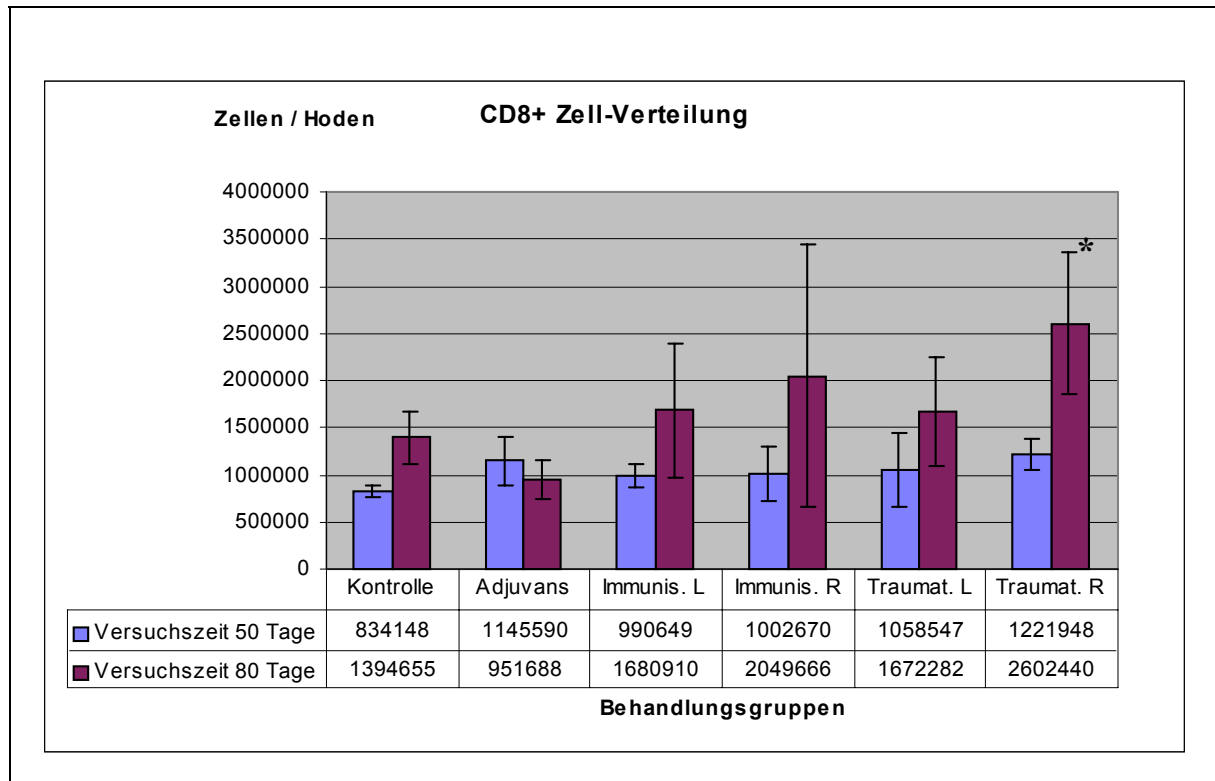
B) Adjuvans Behandlung: Es findet sich die gleiche Verteilung der CD8(+)-Zellen wie in dem Kontrollhoden.

C) Responderhoden einer immunisierten Ratte: Die Granulome sind stark mit CD8(+)-Zellen durchsetzt. Auffällig ist die Konzentration der Zellen um Zentren, die von Zellen und Zelltrümmern gebildet zu sein scheinen. Die umgebenden Tubuli enthalten keine für die Spermatogenese typischen Zellen.

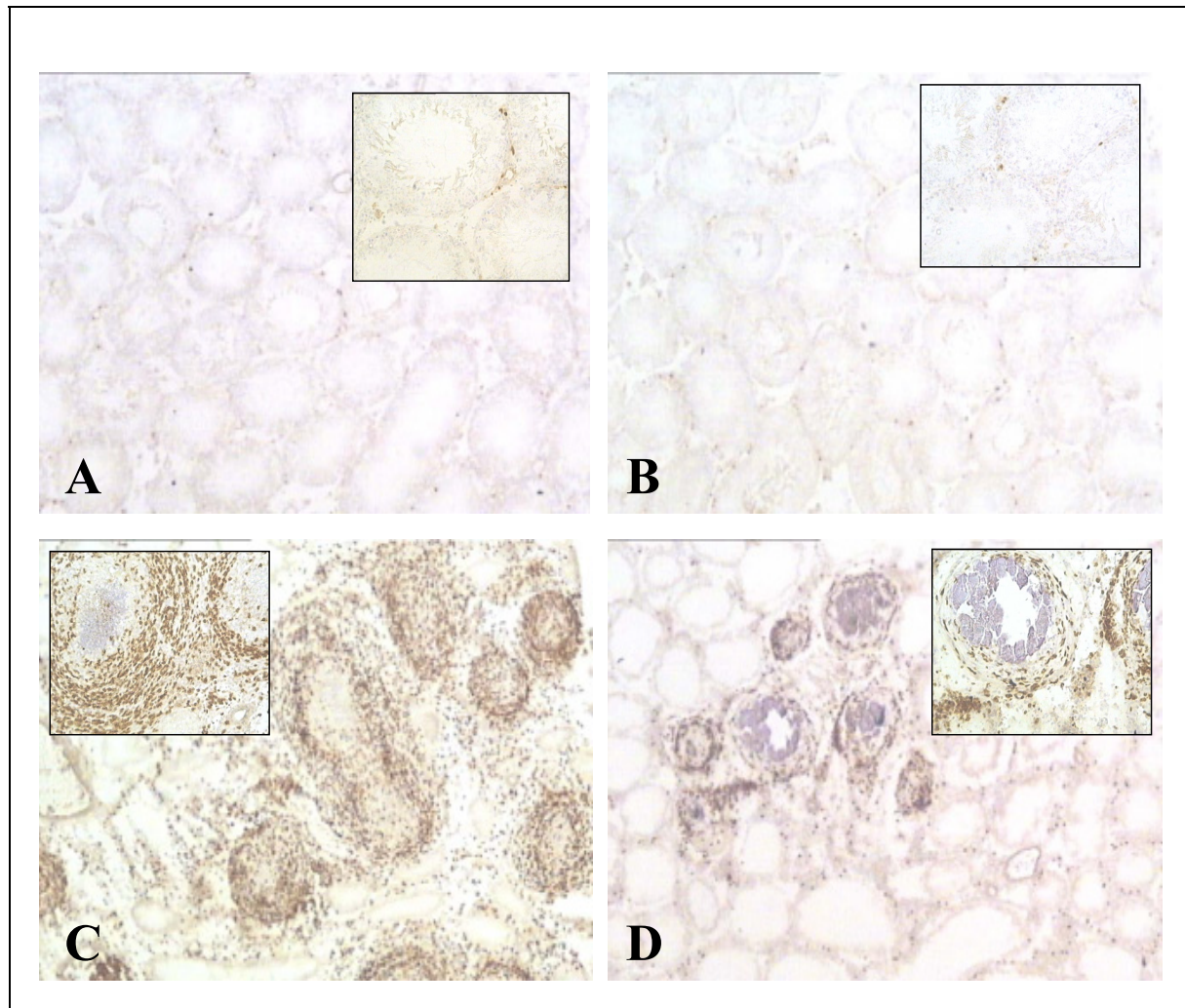
D) Stichkanal eines traumatisierten Hodens, der von Entzündungszentren mit stark CD8(+)-Zellen umringt ist. Die umgebenden Tubuli zeigen keine spermatogenesetypischen Zellen. Weiter entfernt eine weitgehend normale Hodenstruktur mit leicht erhöhten CD8(+)-Zellen, die mit zunehmender Entfernung vom Stichkanal Kontrollwerte annimmt.

Sämtliche immunpositiven Zellen sind ausschließlich im Interstitium fokussiert.

Nichtresponderhoden aus der Gruppe der immunisierten Tiere und kontralaterale Hoden aus der Gruppe der traumatisierten Tiere zeigten keinerlei Unterschiede zu den Kontrollhoden der unbehandelten Tiere (nicht gezeigt).

Abbildung 28: CD8(+)-Zellen in der EAO / Statistische Auswertung

Graphische Darstellung der quantifizierten CD8(+)-Zellen der einzelnen Behandlungsgruppen. Signifikant erhöht ist die Zellpopulation in der Gruppe der primär traumatisierten Hoden (*). Hier ist eine Zunahme der Zellzahl von ca. 45% (50 Tage) und ca. 85% (80 Tage nach Behandlung) zu erkennen. Die Zellpopulation der CD8(+)-Zellen zeigt während des Behandlungszeitraums von 30 Tagen eine Akkumulation im Gewebe der Kontrollhoden um 67%.

Abbildung 29: TCR(+)-Zellen in der EAO / Immunhistochemischer Nachweis

Immunhistochemischer Nachweis der α/β T-Zell-Rezeptor(+)-Zellen in den Hoden der verschiedenen Behandlungsgruppen. Eine positive Immunreaktion für den α/β -T-Zell-Rezeptor findet sich in 97% der T-Zellen. Dieses Antigen wurde in dieser Arbeit mit TCR (T-cell-receptor) abgekürzt.

A) Kontrolle: Die TCR(+)-Zellen sind gleichmäßig im Interstitium verteilt.

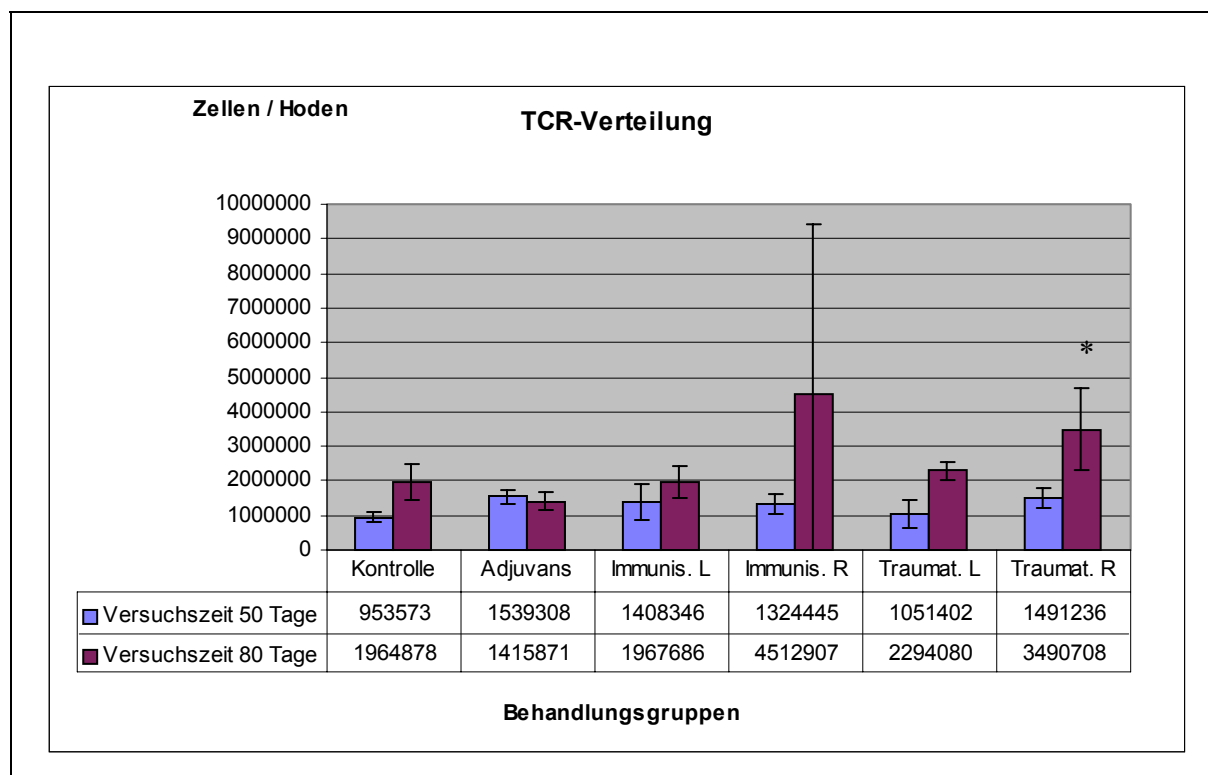
B) Adjuvans-Behandlung: Es findet sich die gleiche Verteilung der TCR(+)-Zellen wie in dem Kontrollhoden.

C) Responderhoden einer immunisierten Ratte: Die Granulome sind stark mit TCR(+)-Zellen durchsetzt. Auffällig ist die Konzentration der Zellen um Zentren, die von Zellen und Zelltrümmern gebildet zu sein scheinen. Die umgebenden Tubuli enthalten keine für die Spermatogenese typischen Zellen.

D) Stichkanal eines traumatisierten Hodens, der von Entzündungszentren mit stark TCR(+)-Zellen umringt ist. Die umgebenden Tubuli zeigen keine spermatogenese-typischen Zellen. Weiter entfernt eine weitgehend normale Hodenstruktur mit leicht erhöhten TCR(+)-Zellen, die mit zunehmender Entfernung vom Stichkanal Kontrollwerte annimmt.

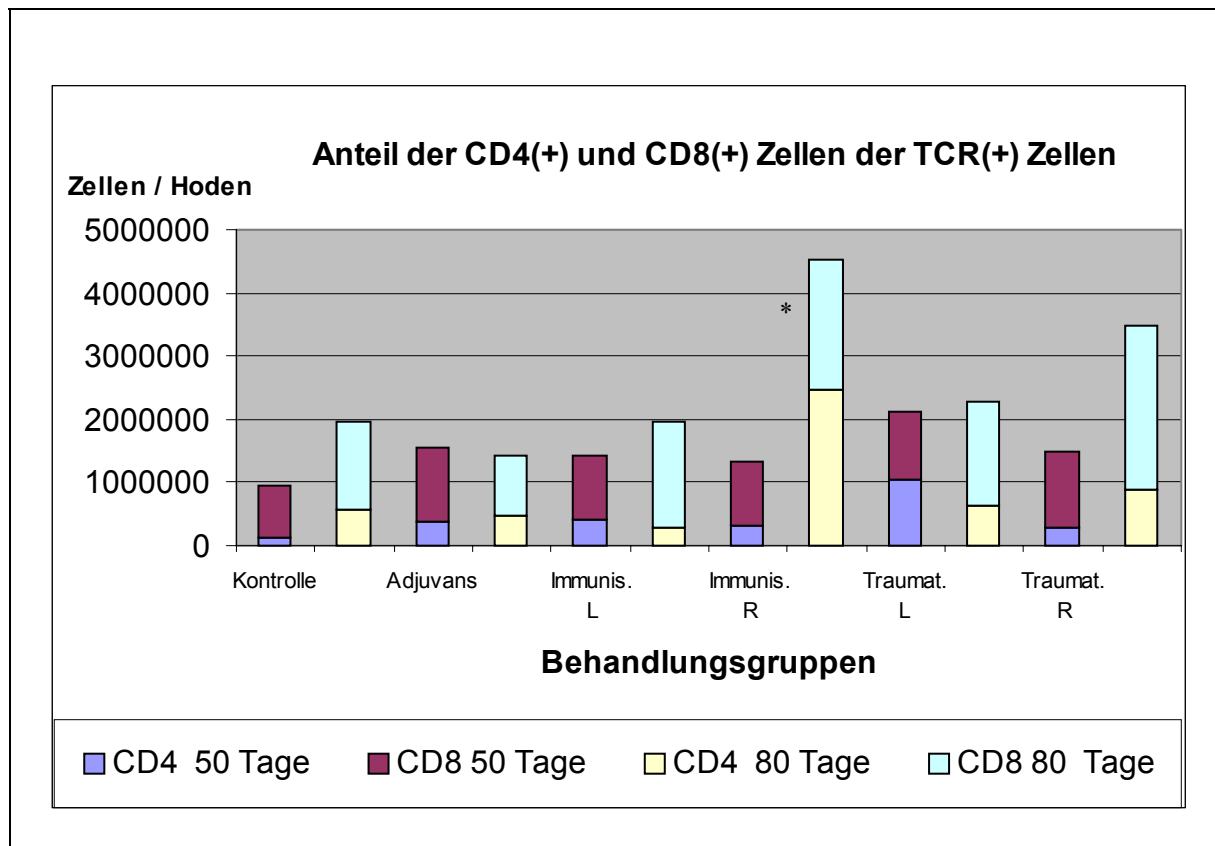
Sämtliche immunpositiven Zellen sind ausschließlich im Interstitium fokussiert.

Nichtresponderhoden aus der Gruppe der immunisierten Tiere und kontralaterale Hoden aus der Gruppe der traumatisierten Tiere zeigten keinerlei Unterschiede zu den Kontrollhoden der unbehandelten Tiere (nicht gezeigt).

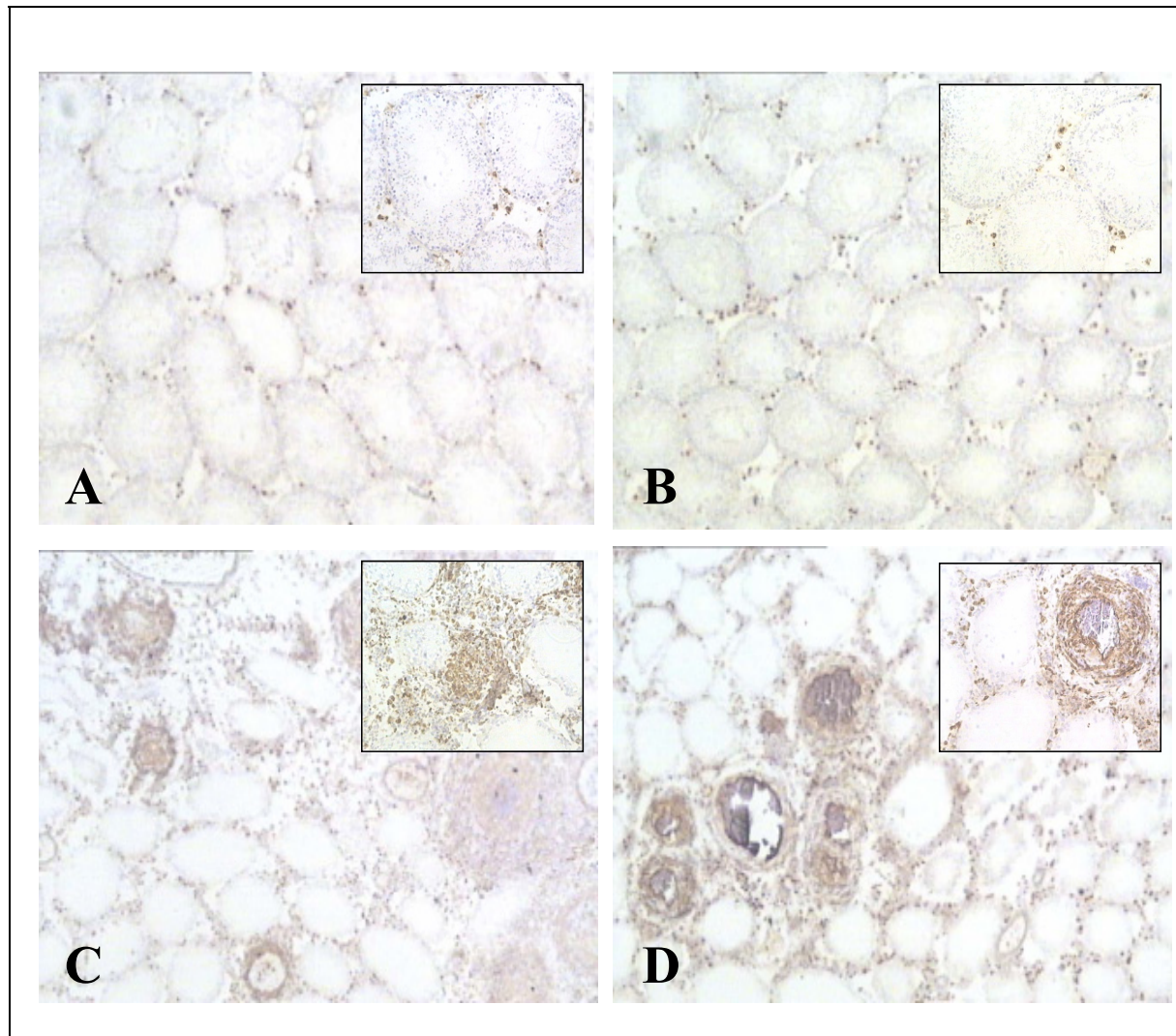
Abbildung 30: TCR(+)-Zellen in der EAO / Statistische Auswertung

Graphische Darstellung der quantifizierten TCR(+)-Zellen der einzelnen Behandlungsgruppen. Signifikant erhöht ist diese Zellpopulation in der Gruppe der primär traumatisierten Hoden (*). Hier ist eine Zunahme der Zellzahlen von ca. 55% (50 Tage) und 77% (80 Tage nach Behandlung) zu erkennen. Auffallend ist auch, daß die TCR(+)-Zellen während der Versuchszeit um ca. 106% akkumulierten.

Abbildung 31: Die errechneten Subpopulationen der CD4(+) und CD8(+)-Zellen der α/β -T-Zellen in der EAO



Graphische Darstellung der errechneten Subpopulationen der CD4(+)- und CD8(+)-Zellen im Pool der α/β -T-Zellen der einzelnen Behandlungsgruppen. Aus dem Gesamtpool der α/β -TCR(+)-Zellen wurden die CD8(+)-Zellen subtrahiert und die erhaltene Differenz als CD4(+)-T-Zellen definiert. Gezeigt ist die Verschiebung der Balance zwischen den CD4(+)- und CD8(+)-Zellen in der Gruppe der immunisierten Tiere 80 Tage (*) nach Behandlung.

Abbildung 32: ED1(+)-Zellen in der EAO / Immunhistochemischer Nachweis

Immunhistochemischer Nachweis von ED1(+)-Zellen in den Hoden der verschiedenen Behandlungsgruppen. Eine positive Immunreaktion für ED1 findet sich in einer Subpopulation der Makrophagen, die als zirkulierende Makrophagen bezeichnet werden. ED1 entspricht dem humanen Antigenhomolog CD68.

A) Kontrollhoden: Die ED1(+)-Zellen sind gleichmäßig im Interstitium verteilt.

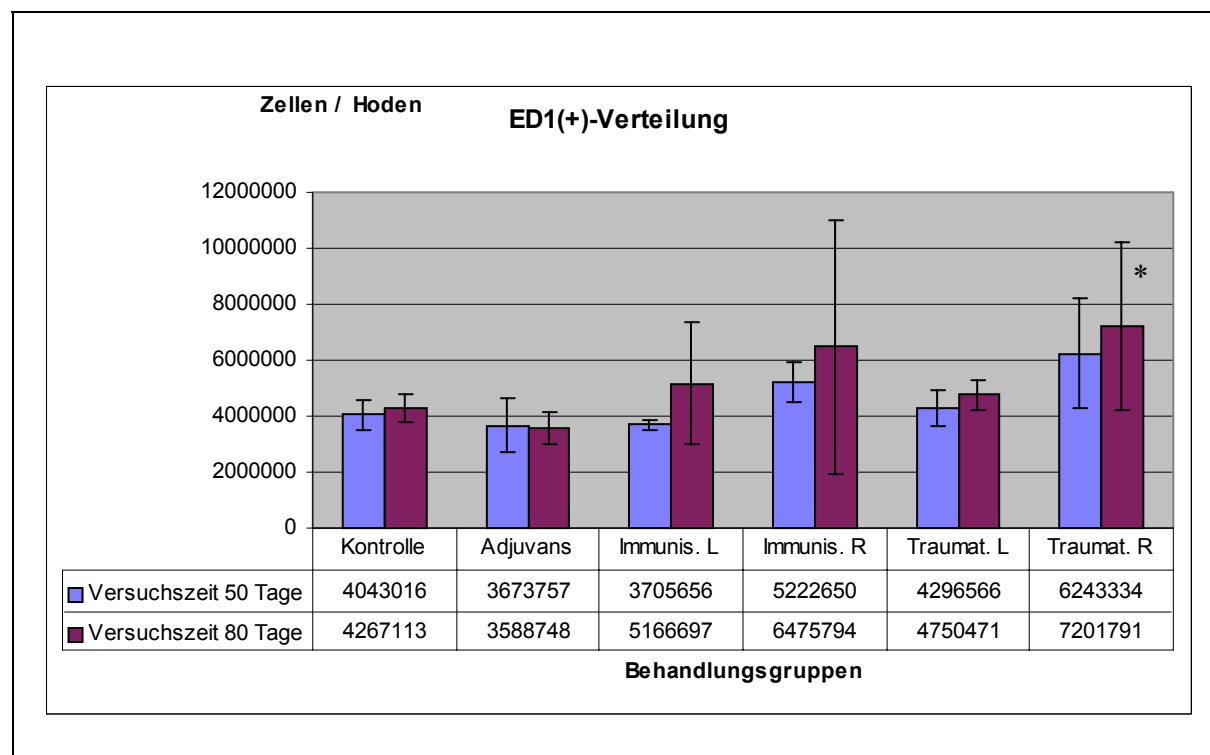
B) Adjuvans-Behandlung: Es findet sich die gleiche Verteilung der ED1(+)-Zellen wie in dem Kontrollhoden.

C) Responderhoden einer immunisierten Ratte: Die Granulome sind stark mit ED1(+)-Zellen durchsetzt. Auffällig ist die Konzentration der Zellen um Zentren, die von Zellen und Zelltrümmern gebildet zu sein scheinen. Wobei in einzelnen ringartig angelegten Zonen unterschiedliche Zellpopulationen vorherrschen, zunächst stellt sich eine Zone von weniger stark ED1 exprimierenden Zellen dar, die von einem Ring stark ED1 positiver Zellen umschlossen wird. Die umgebenden Tubuli enthalten keine für die Spermatogenese typischen Zellen.

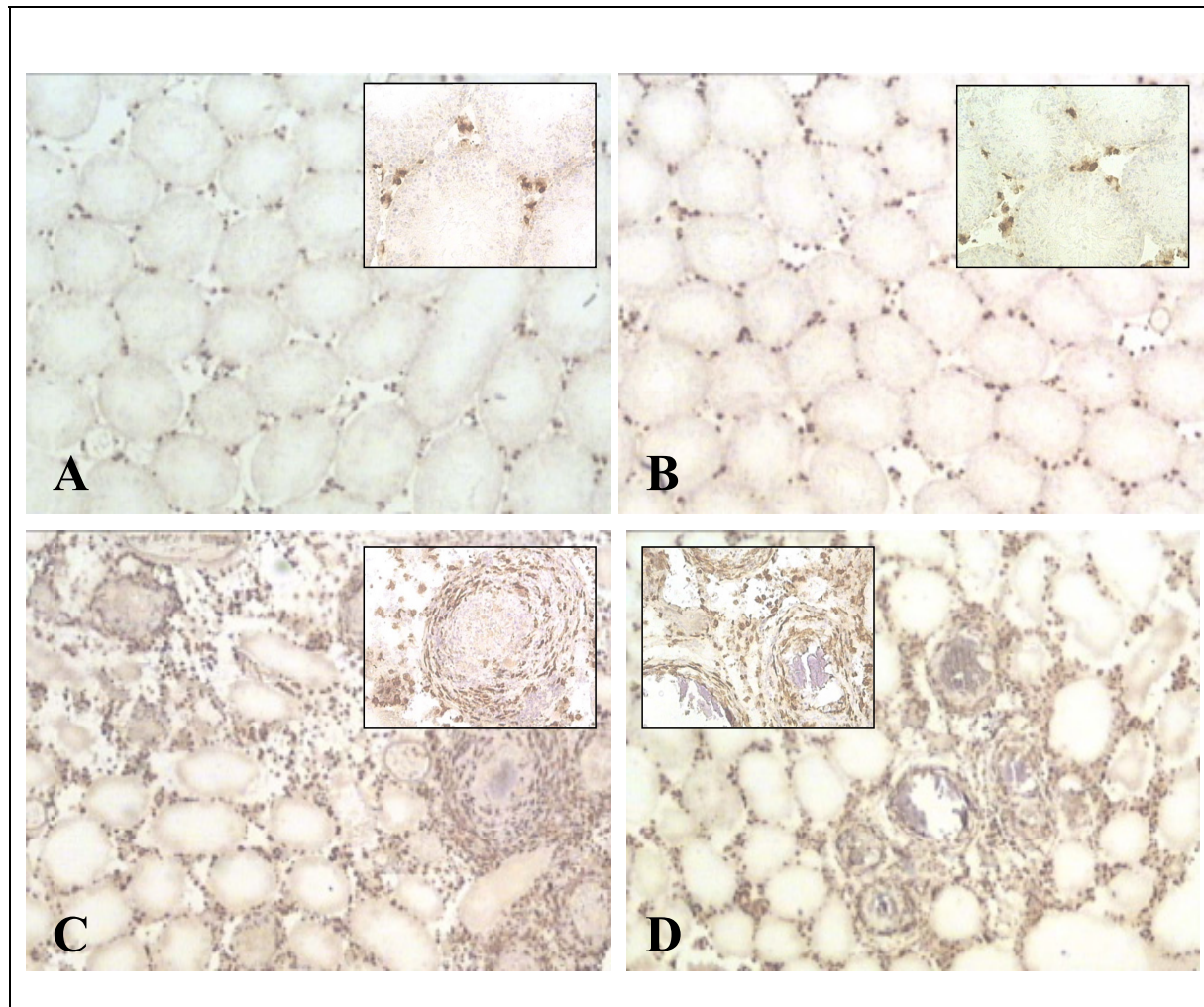
D) Stichkanal eines traumatisierten Hodens, der von Entzündungszentren mit stark ED1(+)-Zellen umringt ist. Die umgebenden Tubuli zeigen keine spermatogenese-typischen Zellen. Weiter entfernt eine weitgehend normale Hodenstruktur mit leicht erhöhten Zahlen an ED1(+)-Zellen, die mit zunehmender Entfernung vom Stichkanal Kontrollwerte annimmt.

Sämtliche immunpositiven Zellen sind ausschließlich im Interstitium fokussiert.

Nichtresponderhoden aus der Gruppe der immunisierten Tiere und kontralaterale Hoden aus der Gruppe der traumatisierten Tiere zeigten keinerlei Unterschiede zu den Kontrollhoden der unbehandelten Tiere (nicht gezeigt).

Abbildung 33: ED1(+)-Zellen in der EAO / Statistische Auswertung

Graphische Darstellung der quantifizierten ED1(+)-Zellen der einzelnen Behandlungsgruppen. Signifikant erhöht ist diese Zellpopulation in der Gruppe der primär traumatisierten Hoden (*). Hier ist eine Zunahme der Zellzahlen von ca. 50% (50 Tage) und 70% (80 Tage nach Behandlung) zu erkennen.

Abbildung 34: ED2(+)-Zellen in der EAO / Immunhistochemischer Nachweis

Immunhistochemischer Nachweis von ED2(+)-Zellen in den Hoden der verschiedenen Behandlungsgruppen. Eine positive Immunreaktion für ED2 findet sich in einer Subpopulation der Makrophagen, die als residente Makrophagen im Hoden bezeichnet werden.

A) Kontrollhoden: Die ED2(+)-Zellen sind gleichmäßig im Interstitium verteilt.

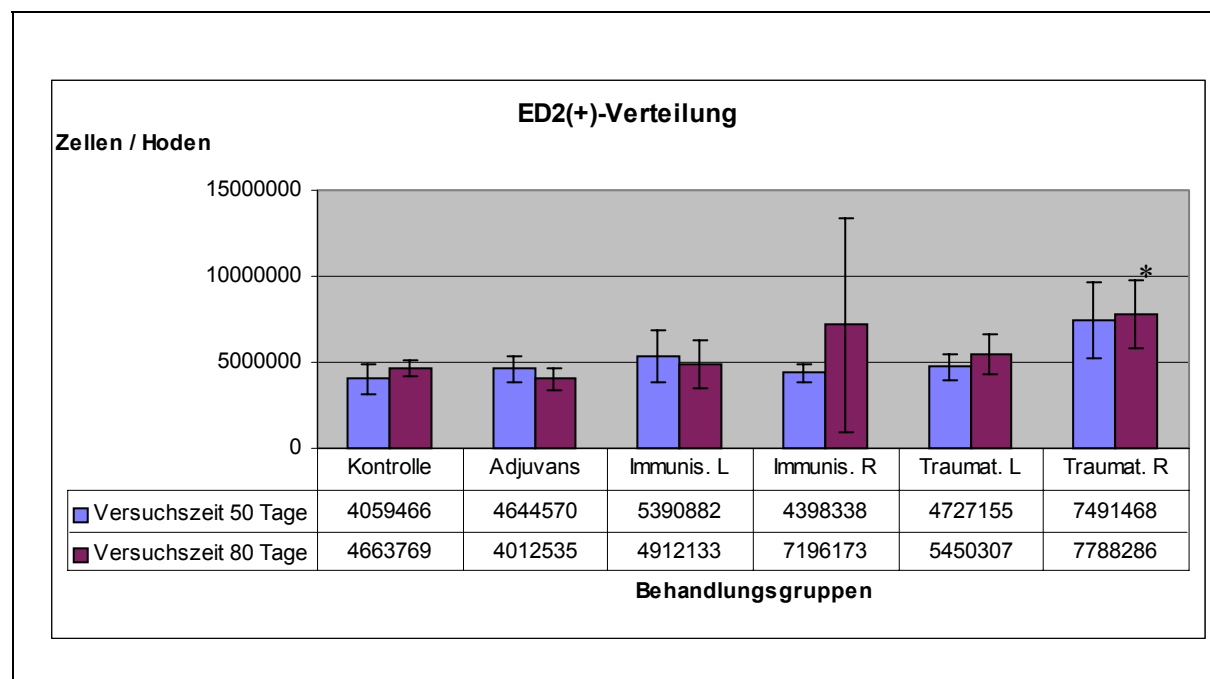
B) Adjuvans-Behandlung: Es findet sich die gleiche Verteilung der ED2(+)-Zellen wie in dem Kontrollhoden.

C) Responderhoden einer immunisierten Ratte: Die Granulome sind stark mit ED2(+)-Zellen durchsetzt. Auffällig ist die Konzentration der Zellen um Zentren, die von Zellen und Zelltrümmern gebildet zu sein scheinen. Die Tubuli in dieser Hodenregion sind leer und zeigen keine spermatogenesetypischen Zellen.

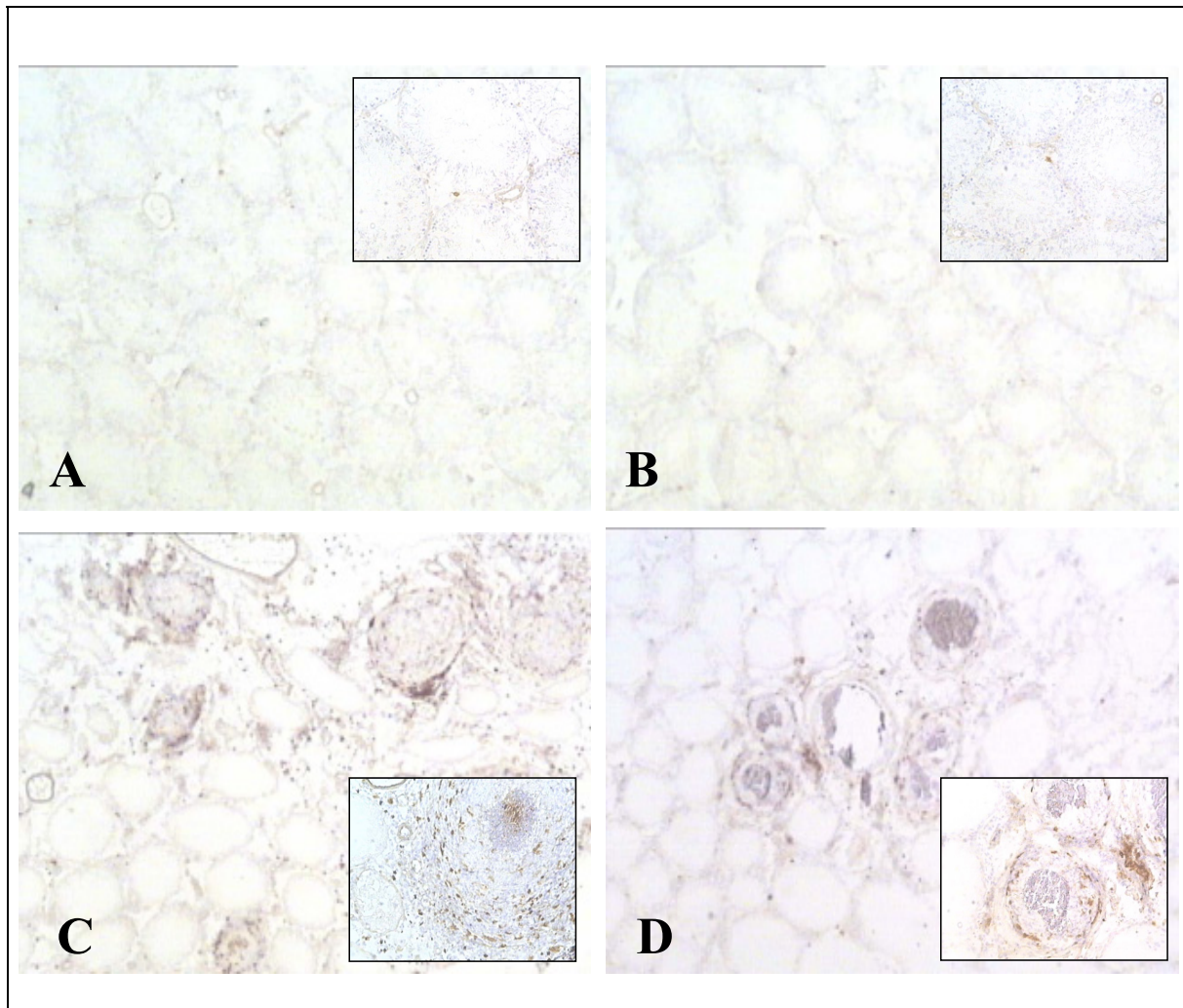
D) Stichkanal eines traumatisierten Hodens, der von Entzündungszentren mit stark ED2(+)-Zellen umringt ist. Die umgebenden Tubuli zeigen keine spermatogenese-typischen Zellen. Weiter entfernt eine weitgehend normale Hodenstruktur mit leicht erhöhten Zahlen der ED2(+)-Zellen, die mit zunehmender Entfernung vom Stichkanal Kontrollwerte annimmt.

Sämtliche immunpositiven Zellen sind ausschließlich im Interstitium fokussiert.

Nichtresponderhoden aus der Gruppe der immunisierten Tiere und kontralaterale Hoden aus der Gruppe der traumatisierten Tiere zeigten keinerlei Unterschiede zu den Kontrollhoden der unbehandelten Tiere (nicht gezeigt).

Abbildung 35: ED2(+)-Zellen in der EAO / Statistische Auswertung

Graphische Darstellung der quantifizierten ED2(+)-Zellen der einzelnen Behandlungsgruppen. Signifikant erhöht ist diese Zellpopulation in der Gruppe der primär traumatisierten Hoden (*). Hier ist eine Zunahme der Zellzahlen von ca. 70% (50 Tage) und 85% (80 Tage nach Behandlung) zu erkennen.

Abbildung 36: Ox62(+)-Zellen / Immunhistochemischer Nachweis

Immunhistochemischer Nachweis von Ox62(+)-Zellen in den Hoden der verschiedenen Behandlungsgruppen. Eine positive Immunreaktion für Ox62 findet sich in einer Fraktion der professionell antigenpräsentierenden Zellen, den Dendritischen Zellen.

A) Kontrollhoden: Die Ox62(+)-Zellen sind vereinzelt vor allem parakapsulär und parakapillär im Interstitium zu finden.

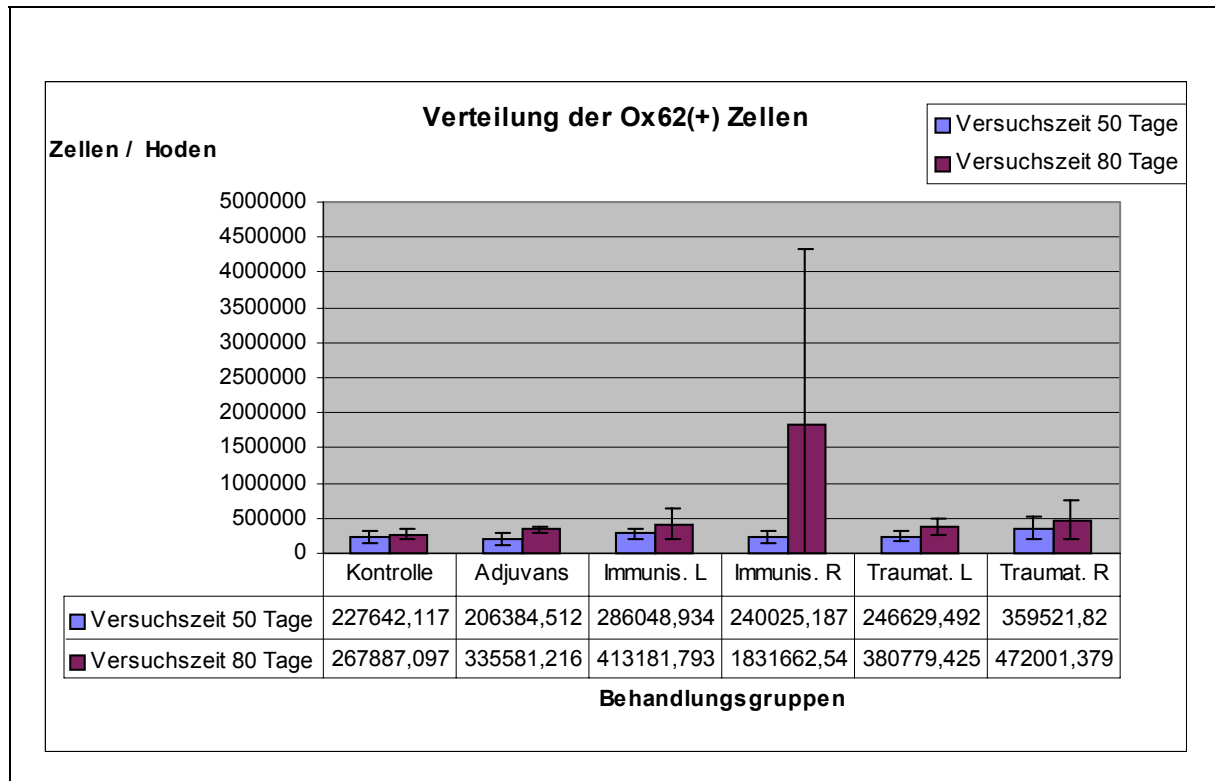
B) Adjuvans-Behandlung: Es findet sich die gleiche Verteilung der Ox62(+)-Zellen wie in dem Kontrollhoden.

C) Responderhoden einer immunisierten Ratte: Die Granulome sind verstärkt mit Ox62(+)-Zellen durchsetzt. Einen hohen Anteil scheinen die Ox62(+)-Zellen an der Bildung des Zentrums dieser granulären Strukturen zu haben, sie sind aber genauso in den umgebenden Strukturen nachzuweisen. Die Tubuli in dieser Hodenregion sind leer und zeigen keine spermatogenese-typischen Zellen.

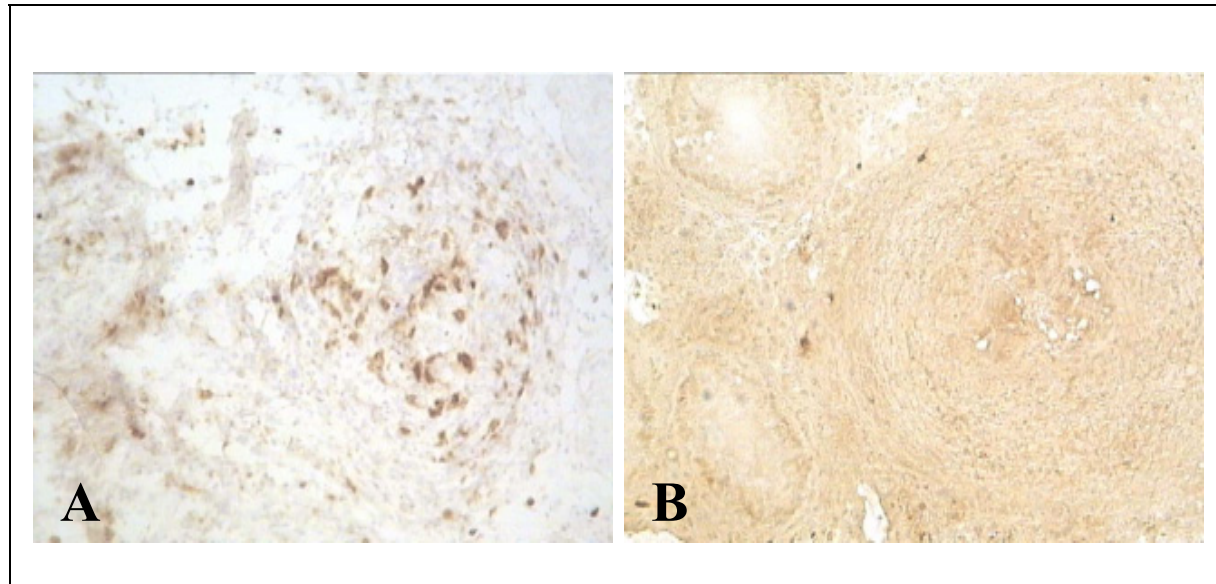
D) Stichkanal eines traumatisierten Hodens, der von Entzündungszentren mit stark Ox62(+)-Zellen umringt ist. Die umgebenden Tubuli zeigen keine spermatogenese-typischen Zellen. Weiter entfernt eine weitgehend normale Hodenstruktur mit leicht erhöhten Zahlen von Ox62(+)-Zellen, die mit zunehmender Entfernung vom Stichkanal Kontrollwerte annimmt.

Sämtliche immunpositiven Zellen sind ausschließlich im Interstitium fokussiert.

Nichtresponderhoden aus der Gruppe der immunisierten Tiere und kontralaterale Hoden aus der Gruppe der traumatisierten Tiere zeigten keinerlei Unterschiede zu den Kontrollhoden der unbehandelten Tiere (nicht gezeigt).

Abbildung 37: Ox62(+)-Zellen in der EAO

Graphische Darstellung der quantifizierten Ox62(+)-Zellen der einzelnen Behandlungsgruppen. Massiv erhöht ist diese Zellpopulation in der Gruppe der rechten Hoden der mit Hodenhomogenat immunisierten Tiere 80 Tage nach Behandlung. Hier ist eine Zunahme der Zellzahlen um 430% nachzuweisen.

Abbildung 38: CD25 und Ki67 in der EAO

A) Immunhistochemischer Nachweis der Zellen, die das CD25-Antigen tragen. Dieses Antigen wird von aktivierten T-Zellen als Interleukin-2-Rezeptor präsentiert. Aktivierte T-Zellen lassen sich nur in den Responderhoden der Hodenhomogenatgruppe (hier gezeigt) und den primär traumatisierten Hoden, hierbei in den entzündlichen Strukturen, finden. In gesunden unveränderten Hoden läßt sich diese Zellart nicht nachweisen.

B) Immunhistochemischer Nachweis des Ki67-Antigens in EAO-Hoden. Dieses nukleäre Protein wurde als Proliferationsmarker verwendet. EAO-Hoden zeigten keine erhöhten Expressionen dieses Markers. Dieses Ergebnis spricht dafür, daß die Zellen nicht an Ort und Stelle proliferieren, sondern eine Migration der Zellen in den Hoden vorliegt.

Die Ergebnisse der Immunzellquantifizierungen zeigen deutlich, daß ein sympathischer Effekt nach Traumatisierung nur in der Gruppe der Auszuchttiere zu zeigen ist.

Alle immunpositiven Zellen wurden ausschließlich im Interstitium des Hodengewebes nachgewiesen. Keine der Immunzellpopulationen konnte in den Tubuli angefärbt werden. Selbst vollständig degenerierte Tubuli zeigten keine Immunzellinfiltrationen.

Die Immunzellinfiltrationen in den Responderhoden zeigten sich nicht als gleichmäßige Infiltration des gesamten Interstitiums, sondern multifocal in granulomartigen Entzündungsherden. Diese Entzündungsherde hatten zentral eine hohe Dichte von Immunzellen, die sich in den Randbereichen etwas verringerte und in den von den Entzündungsherden weiter entfernten interstitiellen Arealen fast auf Niveau von Kontrollhoden absank.

Signifikant verändert waren die untersuchten Zellpopulationen (CD4, CD8, TCR, ED1 und ED2) in den rechten primär traumatisierten Hoden der traumatisierten Gruppe.

Für die Zellpopulationen der CD4(+)-, CD8(+)- und TCR(+)-Zellen läßt sich zwischen Tag 50 und Tag 80 nach Behandlung eine Akkumulation um 45% (CD4(+)), 67% (CD8(+)) und 106% (TCR(+)) errechnen.

Auch die Balance der CD4(+) und CD8(+) T-Zellen war in den EAO-Hoden gestört. In gesunden Hoden existiert eine CD8(+)-T-Zell-Dominanz, die in EAO-Hoden von einer CD4(+)-T-Zell-Dominanz abgelöst wird. So verhält sich die Ratio von CD8/CD4-T-Zellen in Kontrollhoden (KO5) zum EAO-Hoden (HHR43) 9 zu 0,5. Die CD4(+) T-Zellen wurden durch die Substraktion der CD8(+) Zellen von den α/β -TCR(+) Zellen ermittelt.

Für die Ox62 positive Zellpopulation kann eine starke Erhöhung in den rechten Hoden der immunisierten Tiere nach 80 Tagen aufgezeigt werden. Auf Grund der sehr deutlichen Standardabweichung ist dieser Wert jedoch nicht signifikant. Diese große Standardabweichung resultiert aus der Zusammenfassung der Responderhoden und Nichtresponderhoden in der Gruppe der immunisierten Tiere. Auf Grund des zu geringen Anteils an Responderhoden, war eine weitere Aufteilung der Gruppe nicht möglich, da ansonsten die Werte einer Normalverteilung nicht mehr unterliegen würden.

Die CD25(+)-Zellen, konnten überwiegend in den Entzündungszentren nachgewiesen werden. Die Färbung mit dem Ki67-Antikörper zeigte keinerlei Einflüsse der Behandlungen auf die Expression dieses Antigens. Im Interstitium aller Tiere konnten vereinzelt positive Zellen nachgewiesen werden. Weder um degenerierte Tubuli noch in Entzündungszentren konnten erhöhte Zahlen von Ki67(+)-Zellen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis spricht für eine Zellmigration der Zellpopulationen, die während der Pathogenese der EAO quantitativ zunahmen. Eine Proliferation erscheint dagegen kaum vorzukommen.

Zwei weitere Zellpopulationen konnten im Rahmen von Vorversuchen als erhöht in der EAO nachgewiesen werden. Zum einen MHCII(+)-Zellen (Ox6-Antikörper) und zum anderen B-Zellen (Ziege-anti-Ratte-IgG/IgM-Antikörper) (siehe auch 3.4.5).

3.4.5 Zusammenhang der Autoantikörperentwicklung der Rattenstämme Wistar/Kyoto und Lewis bezüglich der Pathogenese der EAO

Ziel dieses Screenings war es, die Serumtiter der Auto-Ak im Verlauf der EAO im Hodengewebe zu untersuchen. Fragestellung dieses Experimentes war der Vergleich der Reaktionsweise der Lewis Ratten (genetische Prädisposition für Autoimmunerkrankungen), mit Wistar/Kyoto Ratten (keine Disposition). Untersucht wurde auch die vom Immunisierungsprotokoll abhängige Antikörperentwicklung, d.h. Einfluß der unterschiedlichen Injektionsstellen und der Adjuvanzusammensetzung. Die Korrelation des humoralen Weges mit dem zellulären Weg des Immunsystems bei der Pathogenese der EAO sollte ebenfalls untersucht werden. Um diese Fragen zu beantworten, wurden die Seren aller Ratten, die in diesem Projekt in die Versuche (I bis III) aufgenommen wurden, auf Autoantikörper getestet.

Gesamthodenhomogenat wurde per SDS-PAGE getrennt und die Seren mit Western-Blot-Analyse auf Autoantigene untersucht. Gezeigt sind hier exemplarisch Rattenserum aus Versuch III. Für jede Bande wurden entsprechend Punkte nach einem Scoresystem vergeben, um den Vergleich der beiden Rattenstämme zu erleichtern.

Abbildung 39: Serum-Autoantikörper gegen Hodenproteine nach der Immunisierung mit und ohne bakterielles Adjuvans in Wistar/Kyoto und Lewis Ratten nach dem Protokoll von Versuch III

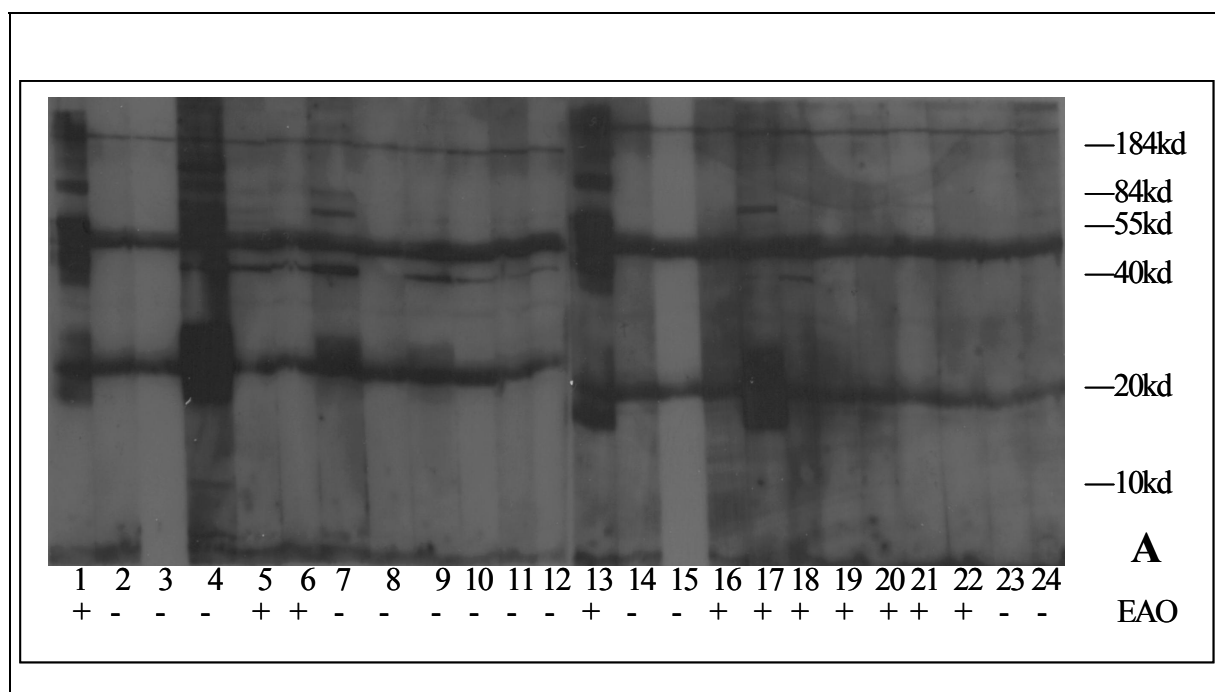
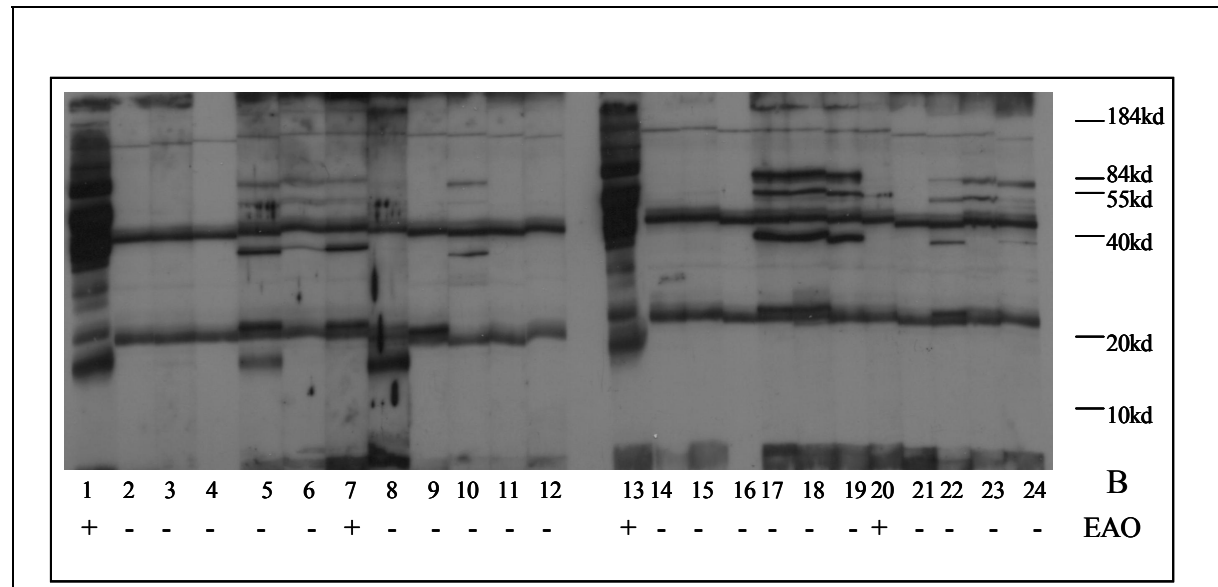
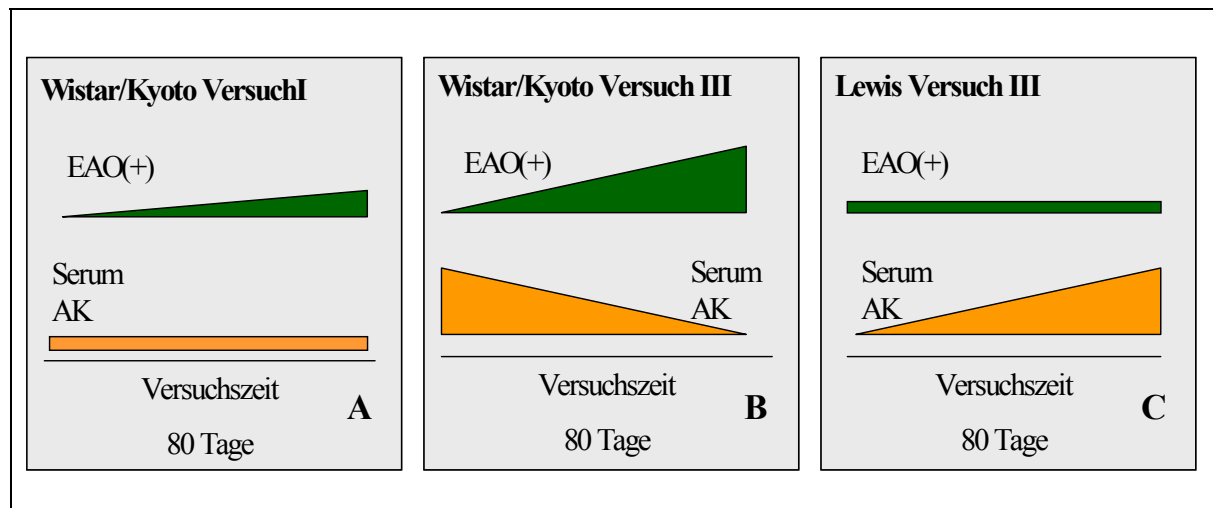


Abbildung 39: Serum-Autoantikörper gegen Hodenproteine nach der Immunisierung mit und ohne bakterielles Adjuvans in Wistar/Kyoto und Lewis Ratten nach dem Protokoll von Versuch III



Gezeigt sind Western-Blot-Analysen der Serum-Autoantikörper der Wistar/Kyoto-Ratten (A) und Lewis Ratten (B) aus der Versuchsreihe III. Gesamthodenhomogenat wurde in einem 13%igem SDS-Gel getrennt und in einem kontinuierlichen Puffersystem auf eine Nitrocellulosemembran geblottet. Als 1. Antikörper wurden die jeweiligen Seren, bzw. Plasmen 1:500 bei 4°C ü.N. inkubiert. Die Detektion erfolgte mit einem α -rat-IgG/IgM (1:400 biotinyliert) Streptavidin-Peroxidase und Chemolumineszenz. Unter den Probennummern die Ergebnisse der EAO-Evaluation nach der morphologischen Beurteilungen der HE gefärbten Gewebeschnitte, (+) für EAO-positive und (-) für EAO negative Tiere. A) 1 und 13: Positivkontrolle ein Tier, mit schwerer Orchitis, 2 und 14: ein Pool an Kontrollseren als Negativkontrolle, 3 und 15: Negativkontrolle (kein Serum), 4-7: Seren von 50 Tage Tieren, die mit Toxin immunisiert wurden, 8-12: Seren von 50 Tage Tieren, die ohne Toxin immunisiert wurden, 16-19: Seren von 80 Tage Tieren, die mit Toxin immunisierten wurden, 20-24: Seren von 80 Tage Tieren, die ohne Toxin immunisiert wurden. B) 1 und 13: Positivkontrolle ein Tier mit schwerer Orchitis, 2,3,14 und 15: zwei Pools an Kontrolltierseren, als Negativkontrolle, 4 und 16: kein Serum als Negativkontrolle, 5-8: Seren von 50 Tage Tieren, die mit Toxin immunisiert wurden, 9-12: Seren von 50 Tage Tieren, die ohne Toxin immunisiert wurden, 17-20: Seren von 80 Tage Tieren, die mit Toxin immunisiert wurden, 21-24: Seren von 80 Tage Tieren, die ohne Toxin immunisiert wurden.

Abbildung 40: Korrelation der Autoantikörperentwicklung und Induktionseffizienz der EAO in Lewis und Wistar/Kyoto Ratten abhängig vom Immunisierungsprotokoll



Gezeigt ist die Korrelation der Serumtiter der Auto-Ak (orange) und der Induktionseffizienz der EAO (grün) der Rattenstämme Wistar/Kyoto und Lewis. Letztere sind bekannt als genetisch prädisponiert bezüglich Autoimmunerkrankungen. Auffällig ist der unterschiedliche Verlauf der Serumautoantikörpertiter der beiden Rattenstämme unter den Bedingungen des Versuchs III (B und C). Während sich die Serumautoantikörper bei den Wistar/Kyoto Ratten über die Versuchszeit verringern, steigen sie bei den Lewis Ratten an. Auch die EAO-Induktionseffizienz zwischen den Stämmen variiert stark. Wistar/Kyoto Ratten entwickeln um so besser eine EAO, je länger die Versuchszeit andauert, während Lewis Ratten keinerlei Varianz in der EAO-Induktionseffizienz über die Zeit aufweisen. Vergleicht man die Abbildungen A und B, so zeigt sich, daß die EAO-Induktion durch das Versuchsprotokoll III und die bakteriellen Epitope verbessert wird. Die Korrelation des humoralen und des zellulären Weges des Immunsystems zeigt, daß die Wistar Ratten stärker über den zellulären Weg reagieren und die Lewis Ratten stärker über den humoralen Weg des Immunsystems.

Auffällig sind die unterschiedlichen EAO-Induktionseffizienzen durch verschiedene Induktionsprotokolle. So haben die Applikationen von bakteriellen Epitopen als Adjuvans einen nicht unwesentlichen Einfluß auf die EAO-Entwicklung. Bakterielle Epitope scheinen sowohl die Entwicklung der EAO als auch die Entstehung von Autoantikörpern zu verstärken. Einen geringeren Einfluß hat die Injektionsstelle auf die Bildung von Autoantikörpern. Hier unterscheiden sich die nach dem Protokoll III (ohne Toxin) immunisierten Tiere (nicht gezeigt) nicht in ihrem Reaktionsmuster von denen, die das Hodenhomogenat nach dem Protokoll I gespritzt bekamen. Ein wesentlicher Unterschied in der Induktionseffizienz der EAO ist auch bezüglich der Injektionsstellenwahl (Inguinalregion oder ganglien-nah) bei den Immunisierungen ohne Toxin nicht zu erkennen. Die Immunisierung nach dem Protokoll des Versuchs III in Verbindung mit den bakteriellen Epitopen zeigt verbesserte Responderraten für den Rattenstamm Wistar Kyoto (siehe auch '3.3.3'). Ein weiterer, nicht unwesentlicher Faktor, für die Entwicklung einer EAO bei den Wistar/Kyoto-Ratten ist die Zeit. Je länger die Tiere im Versuch gehalten wurden, desto

häufiger wurde eine EAO beobachtet. Dieses Ergebniss ist nicht gültig für die Lewis Ratten, hier konnte eine Erhöhung der Autoantikörperspiegel im Verlauf der Versuchszeit festgestellt werden, während die EAO-Entwicklung konstant blieb.

In allen Gruppen fanden sich Tiere, die entweder einen hohen Autoantikörpertiter aufwiesen oder eine EAO-Entwicklung zeigten. Ein direkter kausaler Zusammenhang zwischen der Bildung von Autoantikörpern und der Entwicklung einer EAO kann nicht belegt werden.

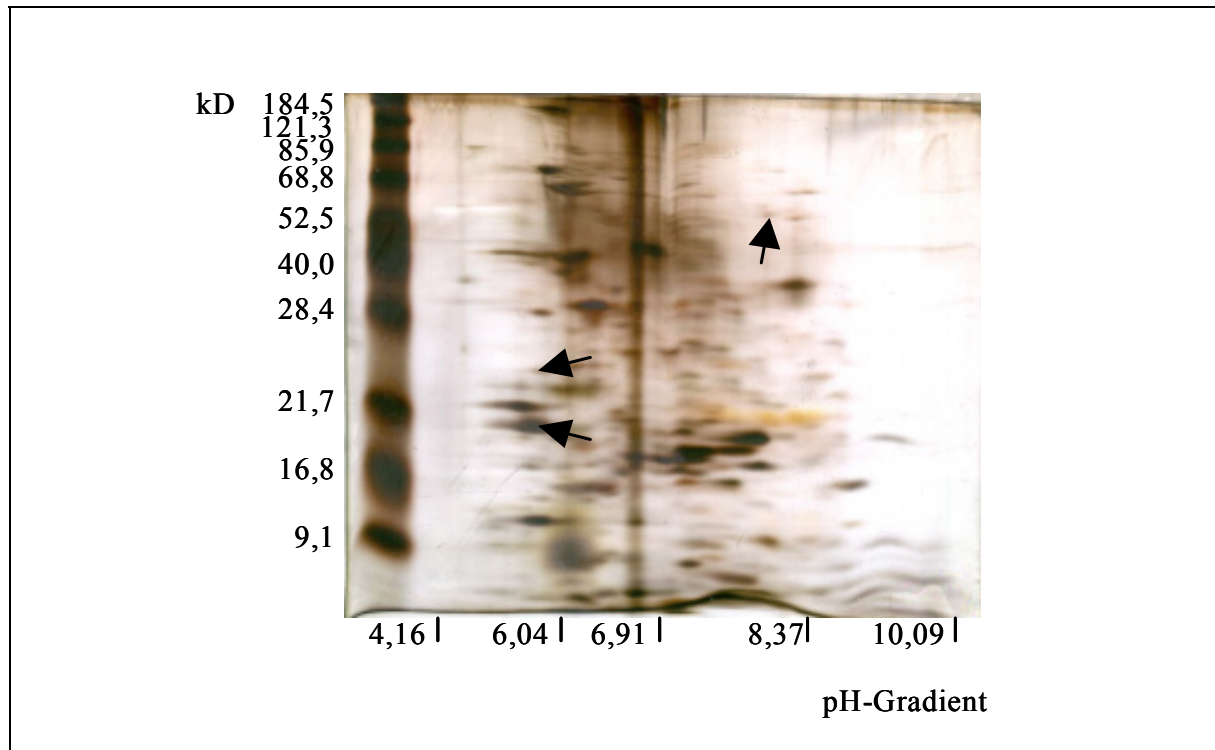
Die sich stark unterscheidenden Reaktionsmuster der beiden Rattenstämme (Wistar/Kyoto und Lewis), trotz gleicher Behandlung, scheint auf genetische Dispositionen zurückführbar zu sein. Wobei es scheint, daß die Wistar Ratten stärker über den zellulären Weg reagieren und die Lewis Ratten stärker über den humoralen Weg des Immunsystems.

3.4.6 Identifikation der Auto-Antigene

Hierzu wurde das Gesamthodenhomogenat per 2-D-Gelelektrophorese aufgetrennt, wobei die erste Dimension durch eine isoelektrische Fokussierung der Proteine erfolgte, woran sich die Trennung nach Molekulargewicht durch SDS-PAGE anschloß.

Mittels Western-Blot-Analyse wurden die auto-antigenen Proteine immunologisch nachgewiesen.

Abbildung 41: Auftrennung des Gesamthodenhomogenates mittels 2-D-Gelelektrophorese

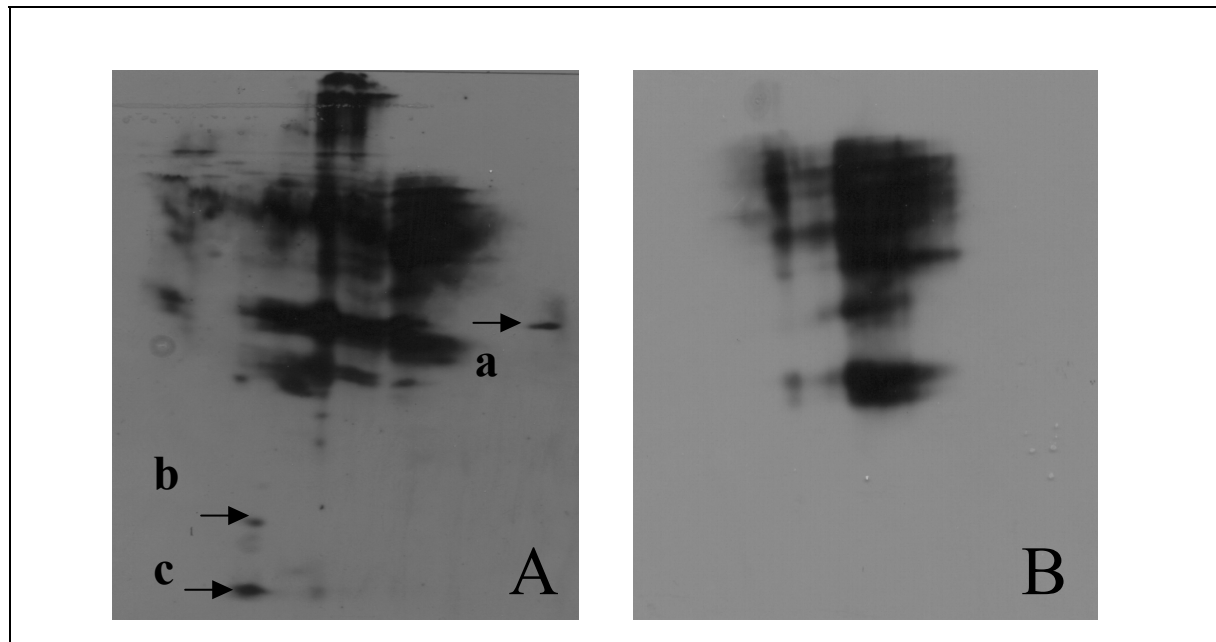


Silbergefärbtes 2-D-Gel mit aufgetrenntem Gesamthodenhomogenat (80µg). Mit Pfeilen markiert sind die aus der entsprechenden PVDF-Membran herausgeschnittenen Proteinspots, die zur weiteren Analyse verwendet wurden. (A) 53kD/pH8,0, B) 28kD/pH5,5, C) 20kD/pH5,5)

Fünf 2 D-Gele wurden zur Analyse des Gesamthodenhomogenates gemacht. Davon wurde ein Gel zur Übersicht mit Silber gefärbt, so daß auch geringe Proteinmengen noch nachgewiesen werden können. Ein weiteres Gel wurde mit Coomassie gefärbt. Drei Gele wurden transferiert, zwei davon auf Nitrocellulosemembranen und eins auf eine PVDF-Membran.

Eine Nitrocellulosemembran wurden wie unter 2.2.5.4 beschrieben mit Serum des EAO positiven Tieres (HH43) inkubiert, um so die Auto-Antigene zu ermitteln. Die zweite Nitrocellulosemembran wurde mit α -rat-IgG/IgM Antikörper als Negativkontrolle ohne 1. Antikörper (Serum) inkubiert.

Abbildung 42: Immunologischer Nachweis der Auto-Antigene auf den Nitrocellulosemembranen



A) Nachweis der Autoantigene. Mit den Pfeilen markiert sind die drei Proteinfraktionen, die aus der PVDF-Membran geschnitten wurden. B) Negativkontrolle: Nachweis ohne 1. Antikörper.

Die PVDF-Membran wurde wie unter 2.2.5.5 beschrieben mit Coomassie gefärbt. Aus dieser Membran wurden dann drei Proteinfraktionen mit folgenden Charakteristika ausgeschnitten:

Probe a: 53kD/pH8,0

Probe b: 28kD/pH5,5

Probe c: 20kD/pH5,5.

Die ausgeschnittenen Membranstücke wurden 2 Tage in Aqua dest. gewässert und anschließend getrocknet. Die Analyse erfolgte durch Dr. Linder, Biochemisches Institut, Universität Giessen.

Folgende Ergebnisse konnten ermittelt werden:

Probe A: Die Probe war zu gering konzentriert, kein Nachweis möglich

Probe B: X;F;(E);A;(S);L;I;Q;G;(H);(L);(H);X;(N);(V)

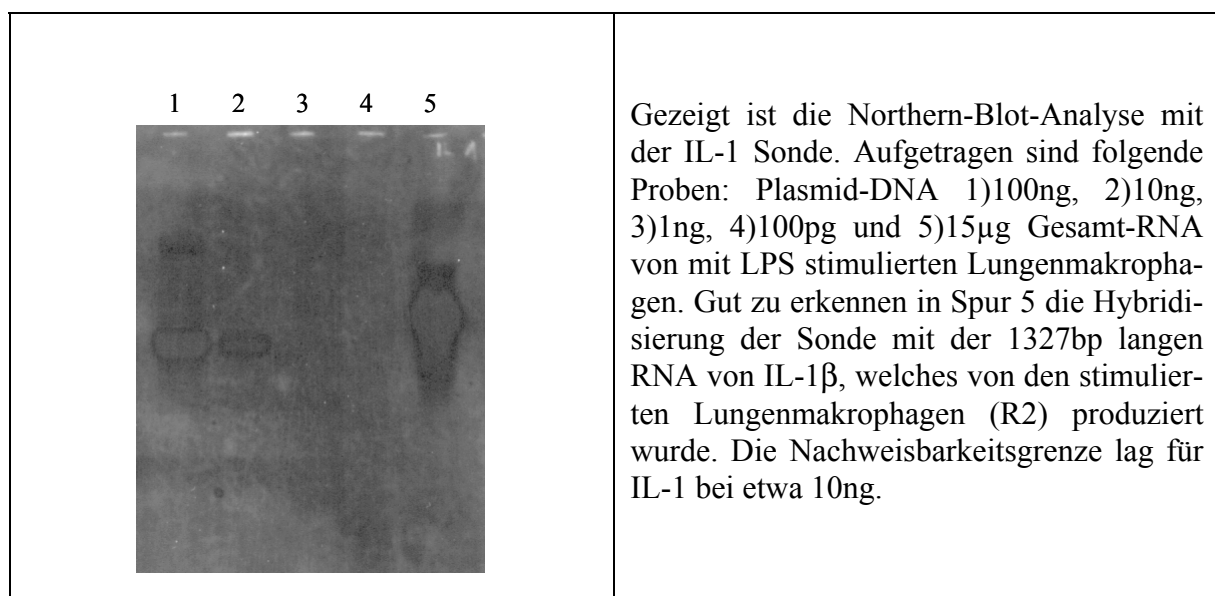
Probe C: N-terminal blockiert, zu geringe Materialmenge

Bis zur Abgabe dieser Arbeit konnten in den allgemein zugänglichen Datenbanken keine bekannten Proteine mit dieser Sequenz gefunden werden.

3.4.7 Cytokinexpression in der EAO

Cytokine als Modulatoren des Immunsystems spielen im Hoden bei der Regulation der Immunzellen, aber auch in der parakrinen/autokrinen Interaktionen der Spermatogenese und Steroidogenese eine wichtige Rolle. Wie diese Cytokine im Verlauf der EAO reguliert werden, wurde auf RNA-Ebene untersucht. Um die Veränderungen der Cytokine IL-1, IL-6, IL-10, MCP-1, TGF- β , und TNF- α während der Pathogenese der EAO zu untersuchen, wurde RNA aus den Versuchstierhoden isoliert und per Northern-Blot-Analyse untersucht. Als Positiv-Kontrolle wurden Plasmidverdünnungen der einzelnen Cytokinsonden und RNA von stimulierten Lungenmakrophagen (R2-Makrophagen) mit den markierten RNA-Sonden hybridisiert.

Abbildung 43: Nachweisgrenzen der RNA-Sonden



Für die Sonden zeigten sich folgende Nachweisgrenzen:

IL-1	10ng	MCP-1	100ng
IL-6	100ng	TGF- α	10ng
IL-10	10ng	TNF- β	10ng

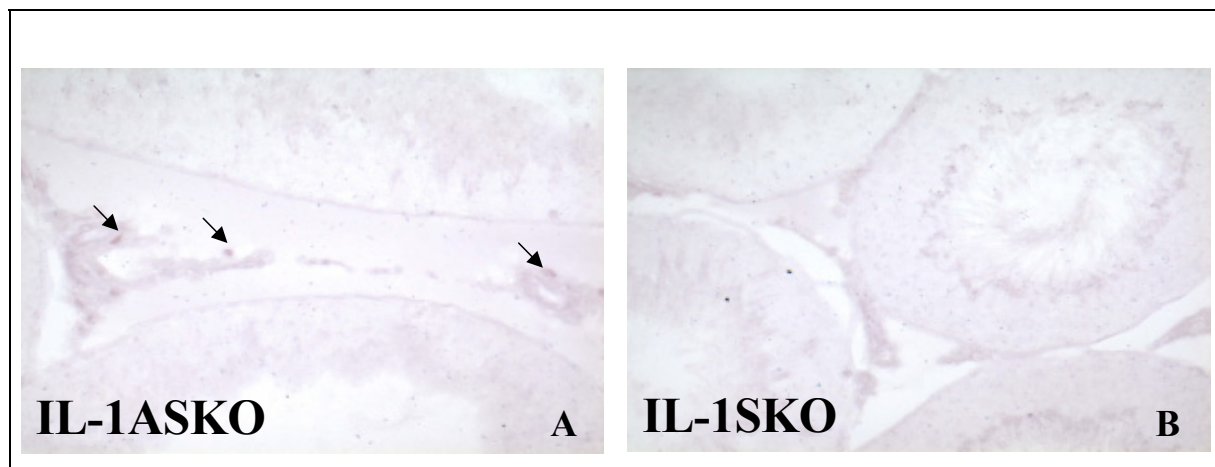
Northern-Blot-Analysen von Gesamthodenhomogenat mit diesen Sonden zeigten allerdings keinerlei Signal. Vermutlich lag der Grund in der geringen Kopienzahl der Cytokine in der RNA. Um die Cytokine mit höheren RNA-Mengen nachweisen zu können, stand nicht mehr genug Hodengewebe der Versuchsgruppen zur Verfügung. Deshalb wurde die Cytokinexpression mittels in-situ-Hybridisierung vorgenommen.

3.4.8 In-situ-Hybridisierung zum Nachweis der Cytokinexpression bei der Pathogenese der EAO

Um eine Aussage über die Cytokinexpression und deren Veränderungen während der Pathogenese der EAO machen zu können, wurden diese in-situ auf RNA-Ebene nachgewiesen. Die Methode hat gegenüber dem Northern-Blot den Vorteil, daß nicht nur die Cytokinexpression generell, sondern auch deren Lokalisation bestimmt werden kann. Wie unter 2.2.10.3 beschrieben, wurden Hodengewebeschnitte mittels in-situ-Hybridisierung untersucht.

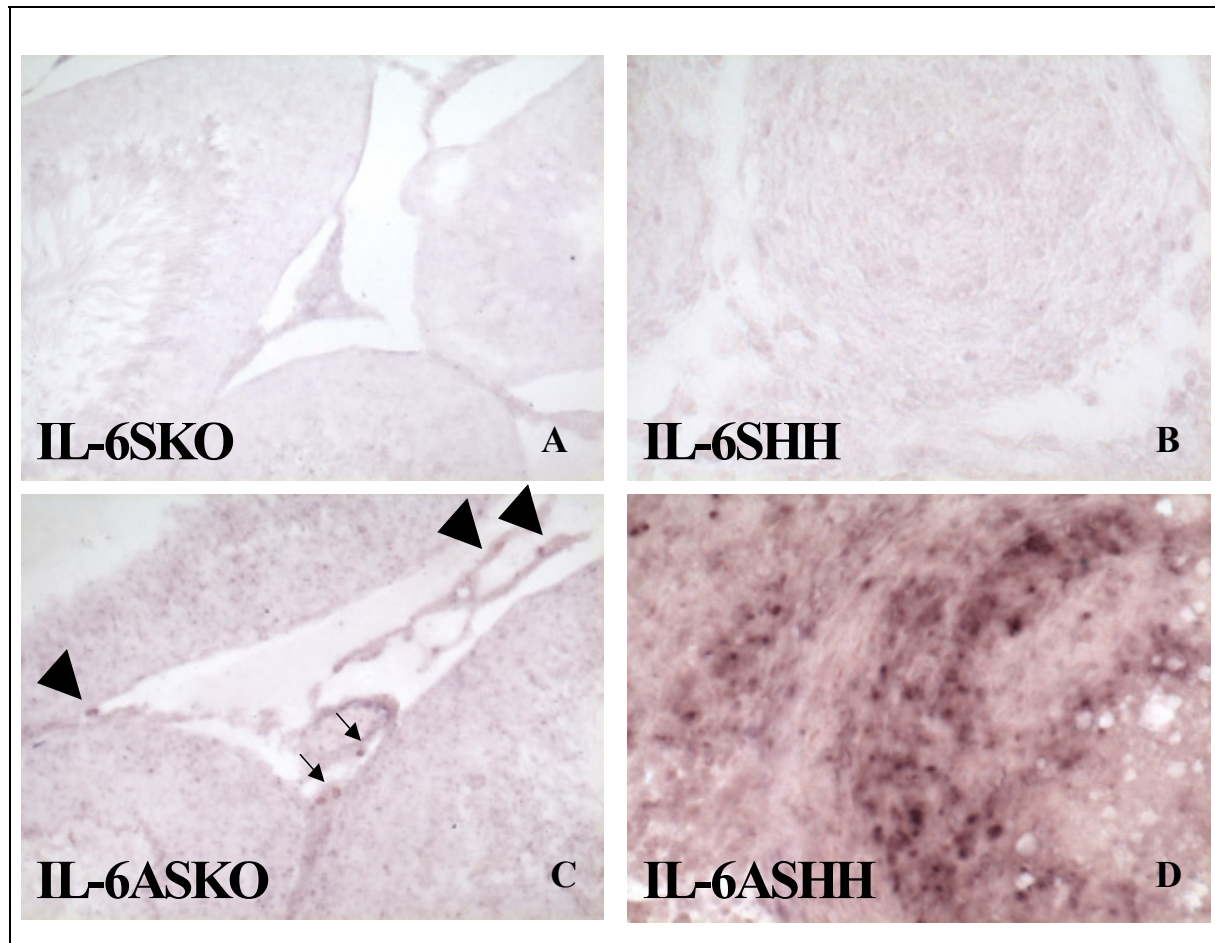
Die Expression des Cytokins IL-1 β wurde in den Leydig-Zellen im interstitiellen Hodengewebe von unbehandelten Kontrollhoden gefunden.

Abbildung 44: in-situ-Nachweis von IL-1 β



A: Verwendung der IL-1 β -Antisense-Sonde in 1:100 Verdünnung. Die Präparate wurden anschließend mit Hämalun gegengefärbt. Pfeile markieren die positive Reaktion in den interstitiellen Leydig-Zellen.

B: Verwendung der IL-1 β -Sense-Sonde in 1:100 Verdünnung als Negativkontrolle. Es zeigen sich keine bzw. nur sehr schwache Hintergrundfärbungen. (AS=Antisense, S=Sense, KO=Kontrollhoden)

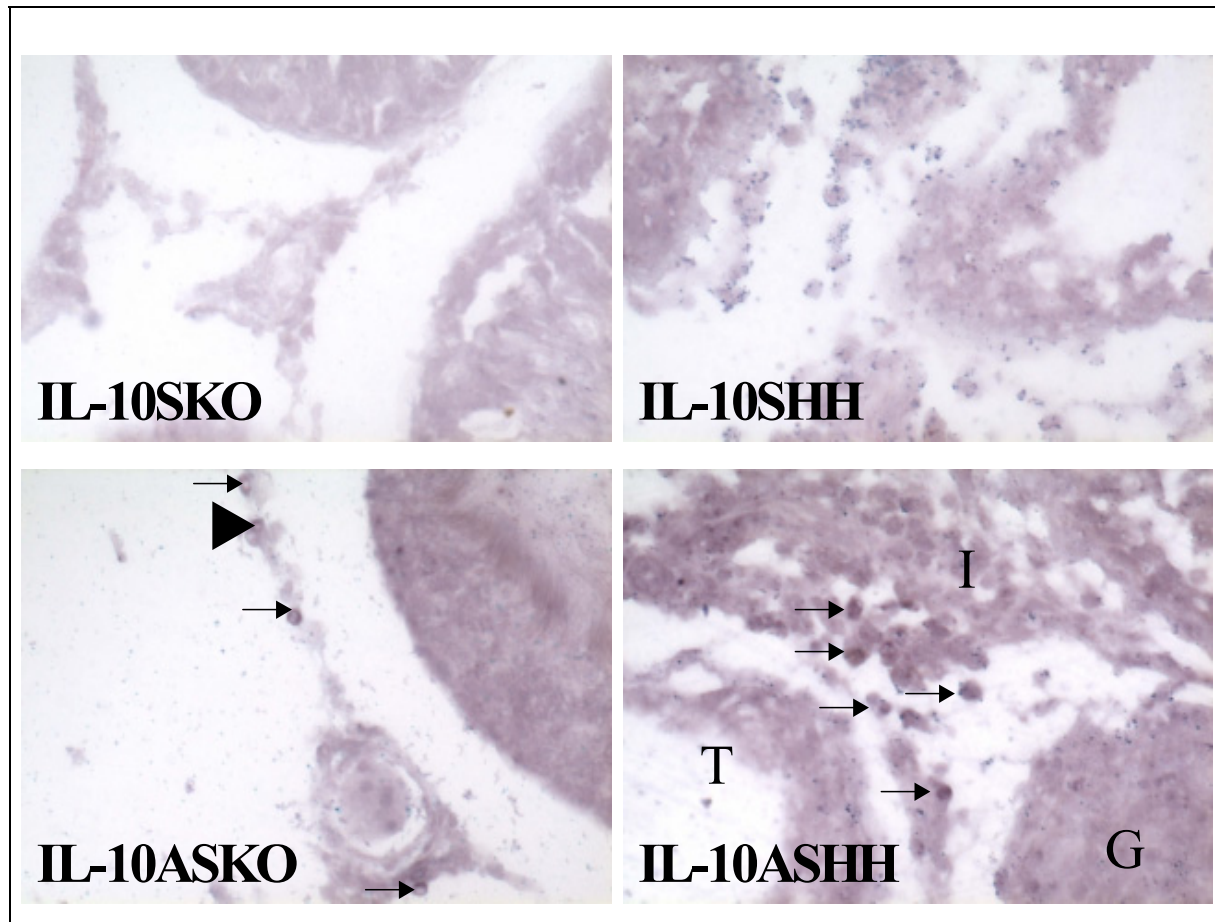
Abbildung 45: in-situ-Hybridisierung von IL-6 bei der Pathogenese der EAO

A und B: Verwendung der IL-6-Sense-Sonde in 1:250 Verdünnung als Negativkontrolle. Es zeigen sich keine bzw. nur sehr schwache Hintergrundfärbungen. **A:** Kontrollhoden. **B:** EAO-Hoden aus der Gruppe der mit Hodenhomogenat immunisierten Tiere.

C und D: Verwendung der IL-6-Antisense-Sonde in 1:250 Verdünnung. Die Präparate wurden anschließend mit Hämalalaun gegengefärbt. **C:** Markiert die positive Reaktion in den interstitiellen Makrophagen (Pfeilspitze) und vereinzelt in Leydig Zellen (Pfeil). **D:** Deutlich zu erkennen ist die Zunahme der IL-6 exprimierenden Makrophagen im Interstitium und in den Granulomen der Responderhoden.

(AS=Antisense, S=Sense, KO- Kontrollhoden, HH=Hoden von mit Hodenhomogenat immunisierten Tieren)

Abbildung 46: in-situ-Hybridisierung von IL-10 bei der Pathogenese der EAO

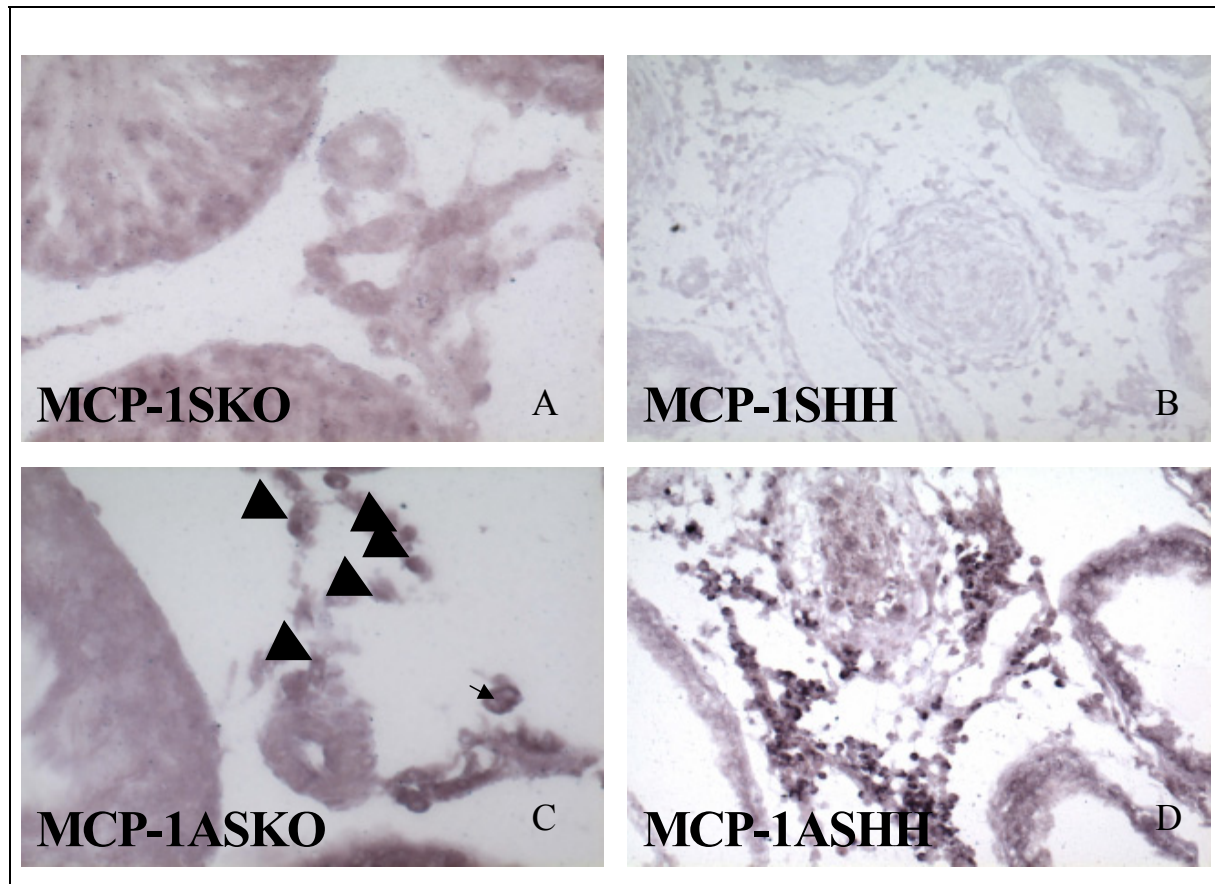


A und B: Verwendung der IL-10-Sense-Sonde in 1:100 Verdünnung als Negativkontrolle. Es zeigen sich keine bzw. nur sehr schwache Hintergrundfärbungen. **A:** Kontrollhoden. **B:** EAO-Hoden aus der Gruppe der mit Hodenhomogenat immunisierten Tiere.

C und D: Verwendung der IL-10-Antisense-Sonde in 1:100 Verdünnung. Die Präparate wurden anschließend mit Hämalun gegengefärbt. **C:** Markiert die positive Reaktion in den interstitiellen Makrophagen (Pfeilspitze) und in Leydig Zellen (Pfeil). **D:** Deutlich zu erkennen ist die Zunahme der IL-10 exprimierenden Makrophagen im Interstitium und in den Granulomen der Responderhoden (I= Interstitium, G= Granulom, T= Tubuli).

(AS=Antisense, S=Sense, KO- Kontrollhoden, HH=Hoden von mit Hodenhomogenat immunisierten Tieren)

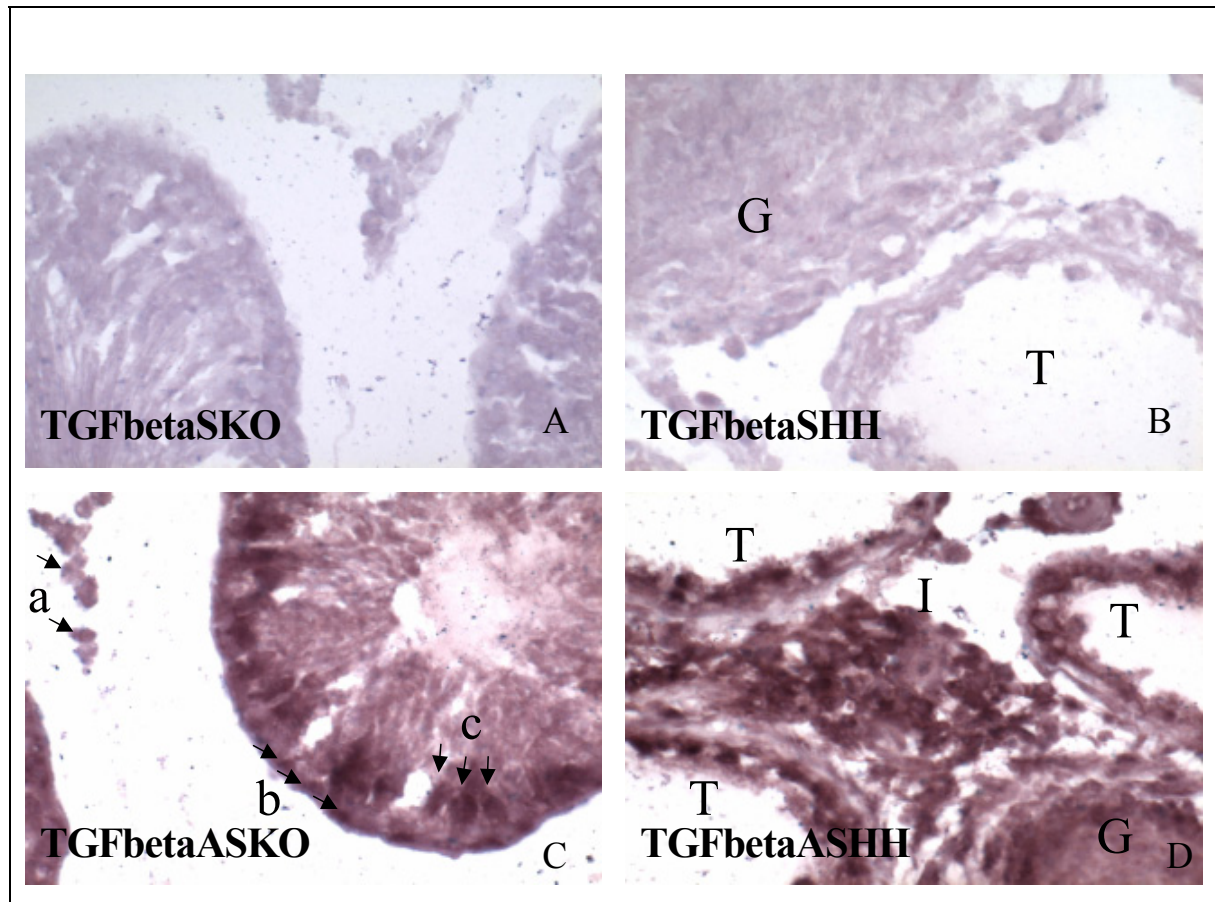
Abbildung 47: in-situ-Hybridisierung von MCP-1 bei der Pathogenese der EAO



A und B: Verwendung der MCP-1-Sense-Sonde in 1:100 Verdünnung als Negativkontrolle. Es zeigen sich keine bzw. nur sehr schwache Hintergrundfärbungen. **A:** Kontrollhoden. **B:** EAO-Hoden aus der Gruppe der mit Hodenhomogenat immunisierten Tiere.

C und D: Verwendung der MCP-1-Antisense-Sonde in 1:100 Verdünnung. Die Präparate wurden anschließend mit Hämalaun gegengefärbt. **C:** Markiert die positive Reaktion in den interstitiellen Makrophagen (Pfeilspitze) und vereinzelt in Leydig Zellen (Pfeil). **D:** Deutlich zu erkennen ist die quantitative und qualitative Zunahme der MCP-1 exprimierenden Makrophagen im Interstitium der Responderhoden.

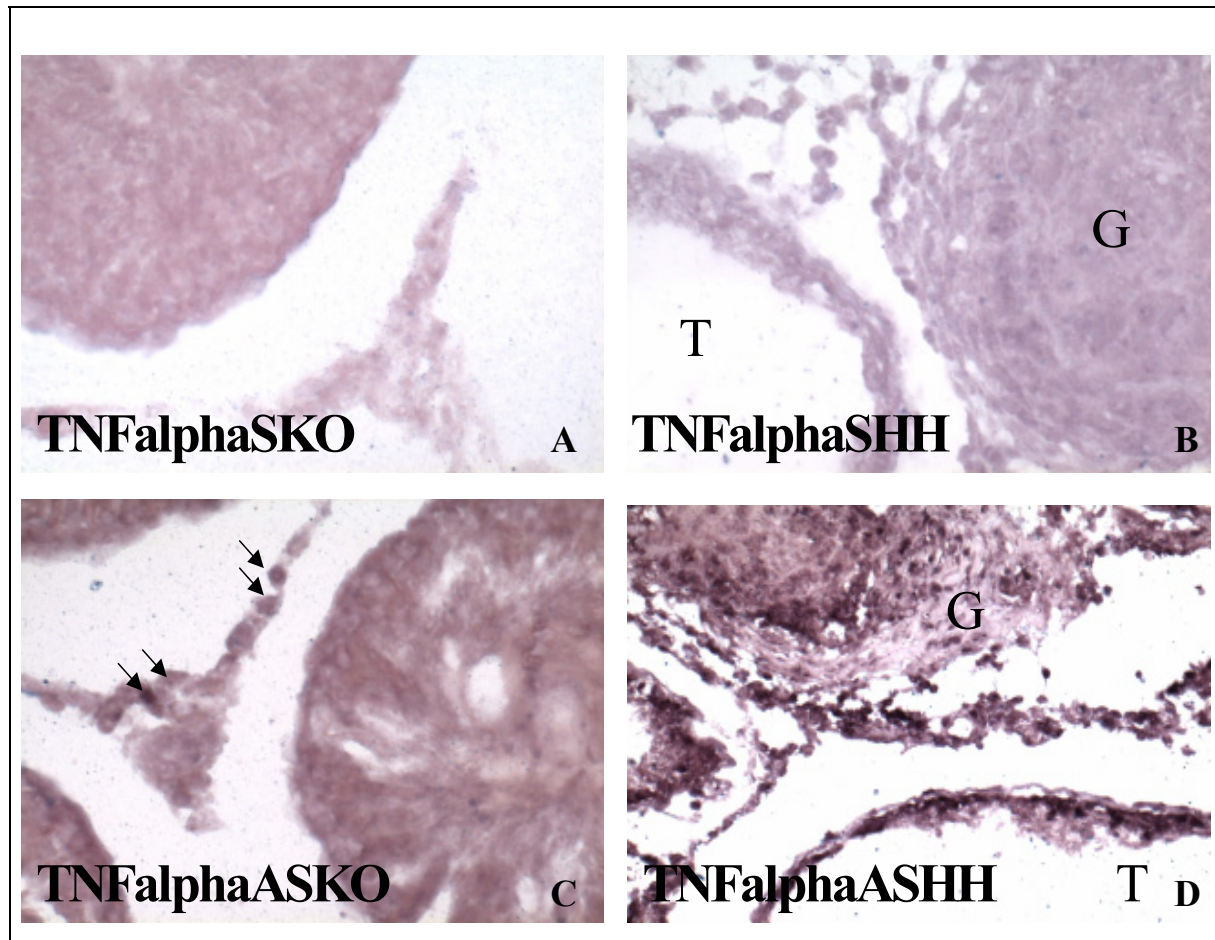
(AS=Antisense, S=Sense, KO- Kontrollhoden, HH=Hoden von mit Hodenhomogenat immunisierten Tieren)

Abbildung 48: in-situ-Hybridisierung von TGF- β bei der Pathogenese der EAO

A und B: Verwendung der TGF- β -Sense-Sonde in 1:200 Verdünnung als Negativkontrolle. Es zeigen sich keine bzw. nur sehr schwache Hintergrundfärbungen. **A:** Kontrollhoden. **B:** EAO-Hoden aus der Gruppe der mit Hodenhomogenat immunisierten Tiere.

C und D: Verwendung der TGF- β -Antisense-Sonde in 1:200 Verdünnung. Die Präparate wurden anschließend mit Hämalaun gegengefärbt. **C:** Markiert die positive Reaktion in interstitiellen Zellen (a), in Spermatogonien (b) und Sertoli Zellen (c). **D:** Deutlich zu erkennen ist die quantitative und qualitative Zunahme der TGF- β exprimierenden Makrophagen im Interstitium und den Tubuliresten der Responderhoden (T= Tubuli, G= Granulom, I= Interstitium).

(AS=Antisense, S=Sense, KO- Kontrollhoden, HH=Hoden von mit Hodenhomogenat immunisierten Tieren)

Abbildung 49: in-situ-Hybridisierung von TNF- α bei der Pathogenese der EAO

A und B: Verwendung der TNF- α -Sense-Sonde in 1:500 Verdünnung als Negativkontrolle. Es zeigen sich keine bzw. nur sehr schwache Hintergrundfärbungen. **A:** Kontrollhoden. **B:** EAO-Hoden aus der Gruppe der mit Hodenhomogenat immunisierten Tiere.

C und D: Verwendung der TNF- α -Antisense-Sonde in 1:500 Verdünnung. Die Präparate wurden anschließend mit Hämalun gegengefärbt. **C:** Markiert die positive Reaktion in interstitiellen Makrophagen (Pfeile) **D:** Deutlich zu erkennen ist die quantitative und qualitative Zunahme der TNF- α exprimierenden Makrophagen im Interstitium und von Spermatogonien in den Tubuliresten der Responderhoden (T= Tubuli, G= Granulom).

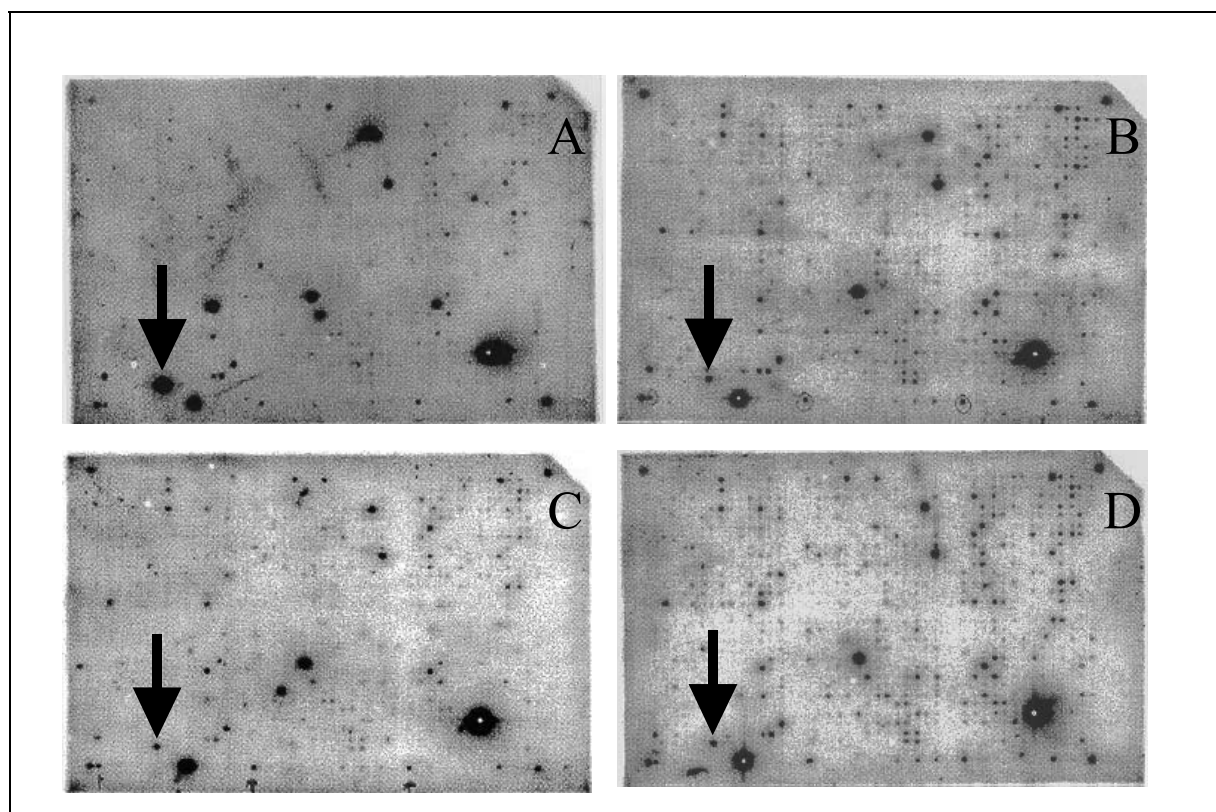
(AS=Antisense, S=Sense, KO- Kontrollhoden, HH=Hoden von mit Hodenhomogenat immunisierten Tieren)

3.4.9 Differentielle Genexpression in der Pathogenese der EAO

3.4.9.1 Ermittlung der differentiell exprimierten Gene während der EAO mittels cDNA-Atlas-Array

Mit dieser Methode war es möglich, mit dem Einsatz von 3 µg RNA, das Expressionsprofil von 1176 verschiedenen Genen zu untersuchen. Von allen Versuchstiergruppen wurden markierte RNA-Proben mit den cDNA-Array-Membranen analysiert.

Abbildung 50: Untersuchung der differentiellen Genexpression in der Pathogenese der EAO mittels cDNA Atlas-Array-Technik



A) unbehandelte Kontrolle, B) mit Hodenhomogenat immunisiertes Tier, C) primär traumatisierter Hoden und D) kontralateraler nicht primär traumatisierter Hoden. Mit den Pfeilen gekennzeichnet sind Dots, die bei den unterschiedlichen Membranen deutlich erkennbar eine differentielle Expression des betreffenden Gens erkennen lassen.

:

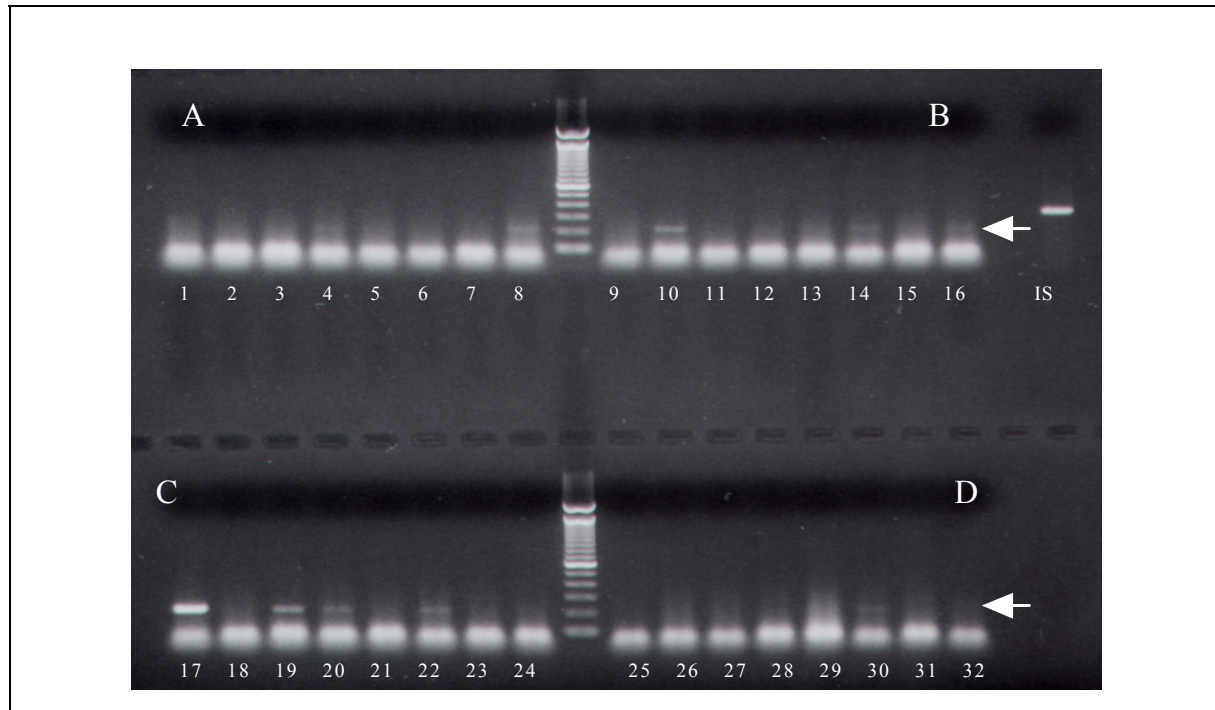
Tabelle 14: Differentiell-exprimierte Gene, die im Rahmen dieser Doktorarbeit weiter untersucht wurden

differentiell exprimiertes Gen und Synonym	Veränderung in der EAO	Vorkommen
T-Zell Ober- flächenglyco- protein CD5 auch T1 und Ly1	konnte im rechten primär traumatisierten Hoden 3fach stärker detektiert werden, als im kontralateralen linken Hoden, außerdem war die Detektierbarkeit in dem Hodenhomogenathoden um das 1,9fache niedriger, als in dem Adjuvant Hoden und konnte im Kontrollhoden nicht gefunden werden,	Thymocyten, T-Zellen und Untergruppen von B-Zellen; bindet CD72 auf B-Zellen
Interleukin 1 Rezeptor Type1 (IL1R1)	konnte nur in der Adjuvant Gruppe gefunden werden	Makrophagen und Epithel- zellen (tote Zellen?); bei Makrophagen und T-Zellak- tivierung
Interleukin 8 Rezeptor beta; CXC Chemo- kinerezeptor 2 (IL8R β)	konnte im Hodenhomogenathoden 1,9fach niedriger bestimmt werden, als im Adjuvanthoden, im kontralateralen traumatisierten Hoden wurde eine 1,9fach niedrigere Expression gemessen, als im Kontrollhoden und im rechten primär traumatisierten Hoden konnte der Rezeptor nicht nachgewiesen werden.	Chemotakti- sches Molekül für Neutro- phile und T- Zellen von Makrophagen
Interleukin 7 Vorläufer (IL7)	konnte nur in dem Hodenhomogenathoden detektiert werden.	Knochen- marksstroma; Wachstum von Prä-B- und Prä-T-Zellen

3.4.9.2 Verifikation der differentiellen Genexpression

Um die cDNA-Atlas-Array Daten zu verifizieren und die statistische Auswertung zu ermöglichen, wurden im cDNA-Array differenziell exprimierte Gene mit einer RT-PCR-Analyse weiter untersucht. Nach der Auftrennung der Proben in einem EtBr enthaltenden Agarosegel, wurde das Gel fotografiert und anschließend digitalisiert.

Abbildung 51: RT-PCR Analyse von IL-8R β in der Pathogenese der EAO



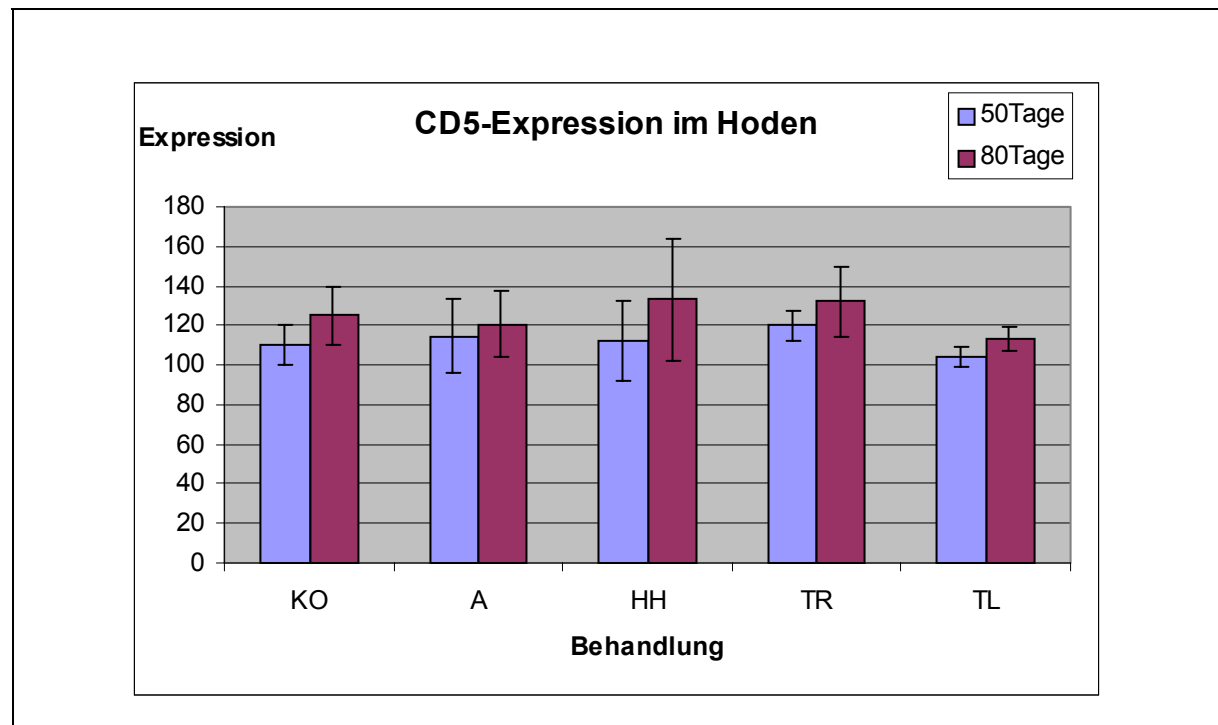
Gezeigt ist exemplarisch eine gelelektrophoretische Auftrennung der mit RT-PCR amplifizierten Fragmente des IL-8R β . A) Kontrolltiere (1-4: 50 Tage; 5-8: 80 Tage), B) Adjuvantstiere (9-12 50 Tage; 13-16 80 Tage), C) immunisierte Tiere (17-20: 50 Tage; 21-24: 80 Tage) und D), traumatisierte Tiere (25-28: 50 Tage; 29-32: 80 Tage) jeweils primär traumatisierte rechte und nicht traumatisierte linke Hoden, IS= interner Standardpool eines GAPDH-Amplifikates (10 μ l) auf jedes Gel aufgetragen, um etwaige Fluoreszenz-, Belichtungs-, und Digitalisierungsunterschiede zwischen den einzelnen Gelen verrechnen zu können.

3.4.9.3 Statistische Untersuchung der mittels RT-PCR überprüften Atlas-Array-Ergebnisse

Die digitalisierten Fotografien wurde mit Hilfe des Programms ScionImage in „relative Expressionswerte“ gewandelt. Diese Werte wurden als linear proportional zu der in der RT-PCR auftretenden Bandenstärke gewertet. Diese relativen Expressionswerte wurden zum einen durch eine RT-PCR des *housekeepinggenes* GAPDH normalisiert. Der zweite Faktor, der in die Berechnung mit einfloß, wurde durch den Internen-Standard (IS) ermittelt. Diese konstante Größe, die auf jedes Gel mit aufgetragen wurde, erfuhr durch die Digitalisierungen und die Umwandlung in Expressionswerte die selben Variationen wie die übrigen Proben des jeweiligen Geles. Das sollte mögliche entstandene Fehler, die durch Beleuchtungsdifferenzen, beim Fotografie-

ren, durch „Scanningfehler“ und die nicht einstellbare Rahmengröße des Auswerteprogramms verringern. Die so erhaltenen Werte wurden mit SigmaStat, einer One-Way-ANOVA und dem Bonferonie-Test unterzogen, um mögliche Signifikanzen unterschiedlicher Expressionen der einzelnen Gruppen festzustellen. Die Erstellung der Graphen erfolgte mittels EXCEL.

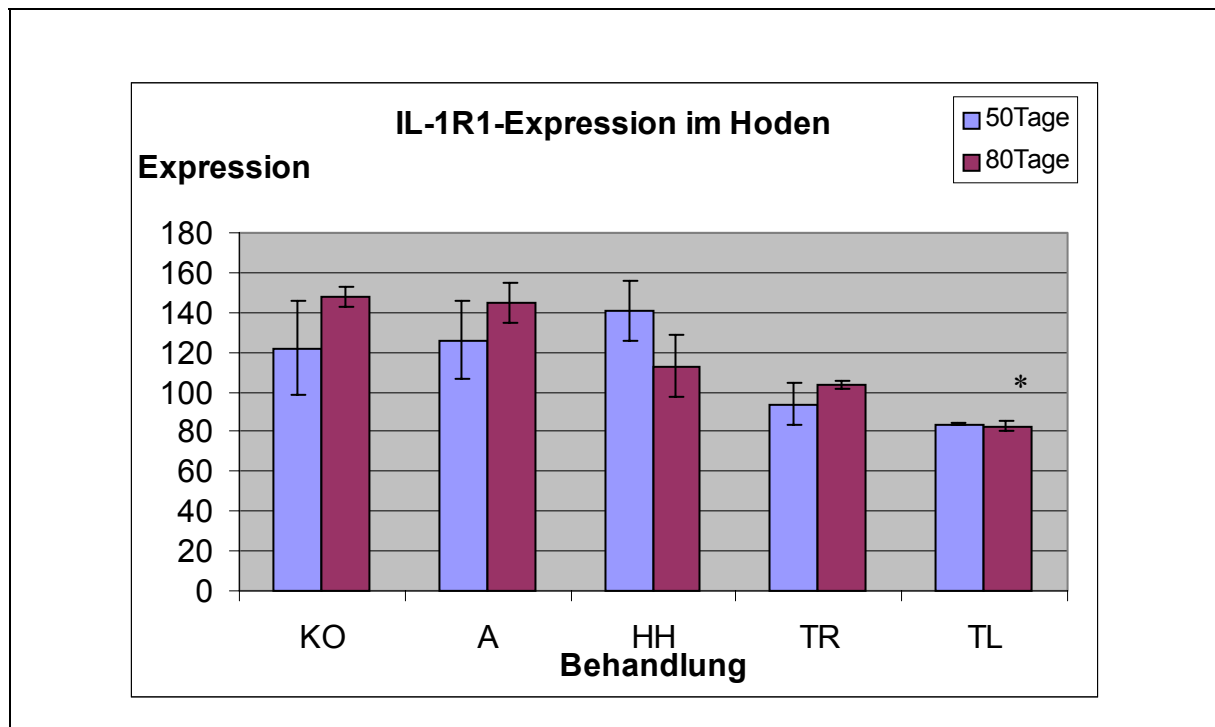
Abbildung 52: Verifikation der CD5-Expression im Hoden mittels semiquantitativer RT-PCR



Ein leichter, nicht signifikanter Anstieg der CD5-Expression im Laufe der Versuchszeit konnte detektiert werden, aber keinerlei Veränderungen zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Die im Atlas Array in der Gruppe der TR 3fach erhöhte Expression bezüglich TL und einer 1,9fachen Erhöhung in der Gruppe A bezüglich der HH-Gruppe konnte nicht bestätigt werden. In den KO Hoden konnte jedoch im Gegensatz zum cDNA-Array eine CD5-Expression nachgewiesen werden. (KO = Kontrollen, A = mit Adjuvans behandelte Tiere, HH = mit Hodenhomogenat immunisierte Tiere, TR = primär traumatisierte rechte Hoden, TL = kontralaterale linke Hoden zu TR).

Zu erwähnen bleibt, daß die Expression in allen Hoden sehr schwach war. Um eine systemische Reaktion auf die EAO-Induktionen zu untersuchen, bzw. mögliche Immunzellstimulationen oder -aktivierungen in den lymphatischen Organen zu erkennen, wurden die in den Hoden differenziell exprimierten Gene auch in Milz und Thymus mittels RT-PCR untersucht. Etwas stärker, aber immer noch gering, konnte die CD5-Expression in Milz und Thymus gezeigt werden, die aber auch keinerlei signifikante systemische Veränderungen in bezug auf die jeweiligen Behandlungsgruppen aufwiesen.

Abbildung 53: Verifikation der IL-1R1-Expression im Hoden mittels semiquantitativer RT-PCR

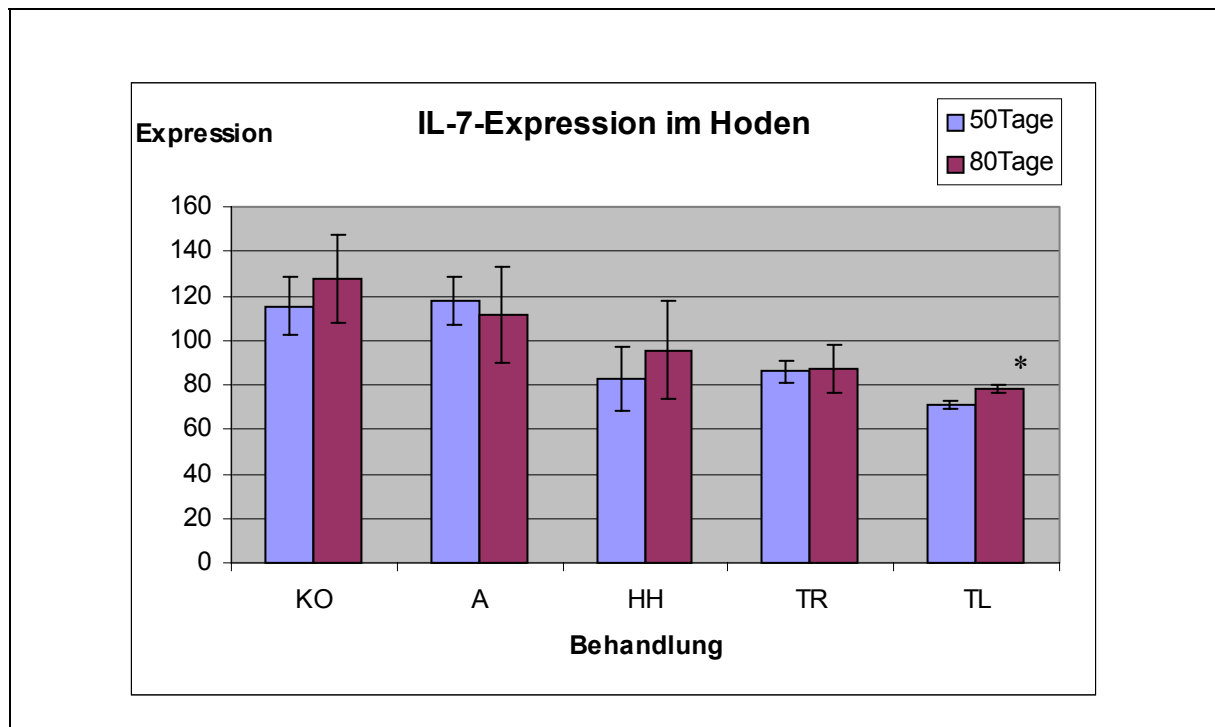


Laut cDNA-Array war dieses Gen nur in der Adjuvantgruppe exprimiert und in allen anderen Behandlungsgruppen nicht nachweisbar. Die Untersuchung mittels der semiquantitativen RT-PCR zeigte jedoch eine signifikante Verringerung in der Gruppe TR 80 Tage im Vergleich zu allen anderen 80 Tage Gruppen. (KO = Kontrollen, A = mit Adjuvans behandelte Tiere, HH = mit Hodenhomogenat immunisierte Tiere, TR = primär traumatisierte rechte Hoden, TL = kontralaterale linke Hoden zu TR).

Es konnte eine signifikante Verringerung der IL-1R1-Expression in den Hoden der Gruppe der TL80-Gruppe, im Vergleich zu den anderen 80 Tage Gruppen gezeigt werden. Auffällig ist die Hochregulation der HH 50 Tage Gruppe und die Herunterregulation in der gleichen Gruppe nach 80 Tagen. Das Ergebnis des cDNA-Arrays konnte mit RT-PCR nicht bestätigt werden.

Die Untersuchung der IL1-1R1 Expression in Milz und Thymus zeigte eine leichte, nicht signifikante Herunterregulation aller Behandlungsgruppen bezüglich der Kontrolltiere, sowohl in der 50 Tage Gruppen als auch der 80 Tage Gruppen.

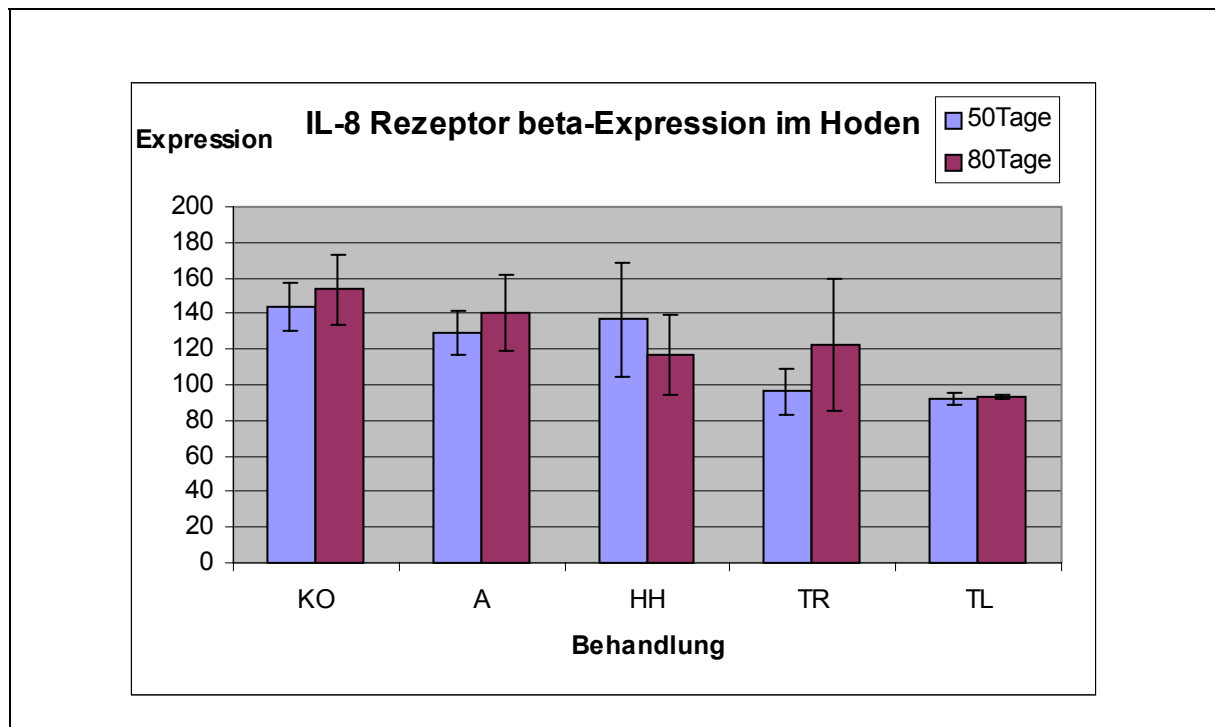
Abbildung 54: Verifikation der IL-7-Expression im Hoden mittels semiquantitativer RT-PCR



Laut cDNA-Array war die IL-7-Expression nur in den Hoden der immunisierten Tiere (HH) zu detektieren. Nach der semi-quantitativen Untersuchung mit RT-PCR konnte jedoch die IL-7-Expression in allen Behandlungsgruppen nachgewiesen werden. In den Behandlungsgruppen A, HH und TR ist die IL-7-Expression schwächer als in der Kontrollgruppe, signifikant verringert ist die IL-7-Expression jedoch nur in der Gruppe TR 80 Tage zu allen Behandlungsgruppen bei 80 Tagen. (KO = Kontrollen, A = mit Adjuvans behandelte Tiere, HH = mit Hodenhomogenat immunisierte Tiere, TR = primär traumatisierte rechte Hoden, TL = kontralaterale linke Hoden zu TR).

Die IL-7 Expression war signifikant verringert in der Gruppe TL80 und verringert in der HH Gruppe nach 50 Tagen. Die Untersuchung der IL-7 Expression in Milz und Thymus zeigte eine konstante Expression in allen Gruppen.

Abbildung 55: Verifikation der IL-8R β -Expression im Hoden mittels semiquantitativer RT-PCR



Ein nicht signifikanter Trend der Werte zeigt sich in den behandelten Gruppen von A über HH und TR und TL, in denen der IL-8-R β herabreguliert scheint. Laut cDNA-Array sollte der IL-8R β in der Gruppe HH 2fach niedriger exprimiert sein als in der Gruppe A und in der Gruppe TL sollte die Expression 2fach niedriger sein als in der Gruppe KO. Beide Untersuchungen demonstrierten eine Herabregulation des IL-8-Rezeptor-Gens durch die Auslösung der EAO. KO = Kontrollen, A = mit Adjuvans behandelte Tiere, HH = mit Hodenhomogenat immunisierte Tiere, TR = primär traumatisierte rechte Hoden, TL = kontralaterale linke Hoden zu TR).

Beide Untersuchungen zur Expression des IL-8-Rezeptor-Gens zeigten eine verminderte Expression nach Behandlungen. Die Ergebnisse des cDNA-Arrays konnten mit der RT-PCR-Analyse bestätigt werden.

Die Untersuchung der IL-8Rbeta Expression in Milz und Thymus der entsprechenden Tiere zeigte keine Veränderung.

4 Diskussion

Die immunologischen Pathomechanismen der experimentellen Autoimmun-Orchitis (EAO) sind Gegenstand dieser Arbeit. Dafür wurde zunächst das Tier-Modell der Ratte mit Hilfe von zwei EAO-Induktions-Möglichkeiten etabliert. Zum einen durch die Immunisierung mit Hodenhomogenat in unterschiedlichen Adjuvansien, zum anderen durch die Traumatisierung eines Hodens. Dabei diente die erste Variante zur Präsentation von Antigenepitopen des Hodens, wie sie bei Infektion oder stumpfen Traumen im Menschen auftreten können und die Stichtraumatisierung imitierte den Effekt einer offenen Verletzung.

Außerdem wurde eine mögliche genetische Prädisposition der EAO durch die Verwendung verschiedener Rattenstämme berücksichtigt. Und die besondere Spezifität der lokalen Immunregulation im Hoden stellt sich durch die Veränderungen von Immunzell-Subpopulationen und der Cytokin-Expressionen bei der Pathogenese der EAO dar. Und letztendlich wurde die Bildung von Autoantikörpern und das Spektrum möglicher Autoantigene charakterisiert.

4.1 Marker der EAO

4.1.1 Die Gesamtkonstitution der Versuchstiere

In keinem der Versuchsansätze waren die Tiere systemisch durch die Behandlung so stark in Mitleidenschaft gezogen, daß dies durch eine Gewichtsreduktion meßbar oder durch eine Verschlechterung des Gesamterscheinungsbildes erfaßbar wurde. Dies spiegelt ein häufig gesehenes Bild in der andrologischen Praxis wieder. So kommen Patienten mit Fertilitätsstörungen nicht mit Symptomen in die Sprechstunde, die primär auf eine Orchitis hinweisen (Hofmann und Kuwert 1979). Trotz des Fehlens anderer Symptome konnte bei 2% der wegen Infertilität untersuchten Patienten eine Orchitis mit Hilfe einer Hodenbiopsie festgestellt werden (Schirren und von Thiesenhausen 1972). Auch potentielle massive Zellinfiltrationen in Milz und Thymus sind nicht gefunden worden. Dies bedeutet, daß weder die Gewichte der Versuchstiere noch vergrößerte lymphatische Organe (Milz und Thymus) als Marker für eine EAO herangezogen werden können.

4.1.2 Der Hoden während der Pathogenese der EAO

Ein nicht-spezifisches Zeichen für eine humane Hodenentzündung können Konsistenzminderung und Volumenabnahme des betroffenen Hodens darstellen (Hofmann und Kuwert 1979, Hofmann 1988). Auch in diesem Projekt konnte eine bereits makroskopisch leicht zu erkennen-

de Verkleinerung der betroffenen Hoden beobachtet werden. Diese Hoden wiesen eine signifikante Gewichtsreduktion um 31% in der 80 Tage Gruppe aller erkrankten Tiere auf. Diese starke Gewichtsreduktion des Hodens läßt sich hauptsächlich auf den fast vollständigen Keimzellverlust der Organe zurückführen und war in diesem Tiermodell ein zuverlässiger Marker für das Vorhandensein einer EAO. Anders wird jedoch in der humanen Praxis gehandelt. Dort empfehlen Haidl und Schill (1991) die Hodenbiopsie zur Abklärung und letztendlichen Diagnosestellung.

Auf die Morphologie der Nebenhodenspermien hatte die EAO-Entwicklung keinen Einfluß. Dies könnte unter anderem daran liegen, daß auch in Tieren mit stark entwickelter EAO noch Hodenareale verblieben, in denen Spermiogenese stattfand. Da sich in den Nebenhoden der partiell degenerierten Hoden keinerlei deformierte Spermien finden ließen, kann ausgeschlossen werden, daß morphologisch auffällige Spermien durch dieses Krankheitsbild induziert werden. Ob diese Spermien auch funktionell unbeeinträchtigt waren, wurde nicht untersucht. Die in diesem Projekt gewonnenen Ergebnisse zeigen jedoch, daß die Spermienmorphologie ebenfalls kein geeigneter Marker für die Diagnose der EAO ist.

4.1.3 DTH und EAO-Entwicklung

Die DTH ist definiert als eine T-Zell-Rekrutierung in aktivierte Gewebe. Diese Aktivierung geschieht durch die Ausschüttung pro-inflammatorischer Cytokine (Kalish et al., 1999). Da die EAO ebenfalls eine T-Zell vermittelte Erkrankung darstellt, ist es offensichtlich, daß die DTH in der Induktion dieses Krankheitsbildes eine Schlüsselrolle spielen kann (Sakamoto et al., 1995). Um eine DTH, gemessen als Fußsohlenreaktion (FSR), als möglichen Marker für eine erfolgreiche Induktion der EAO heranzuziehen, wurden in der Versuchsreihe 3 die entsprechenden Lösungen auch in das Unterhautgewebe der hinteren Fußsohlen injiziert (siehe auch 2.2.1.4). Eine DTH ist dort leicht an einer FSR zu erkennen (siehe Abbildung 7). Beiden Rattenstämmen wurden die Injektionslösungen nach dem unter 2.2.1.4 aufgeführten Muster injiziert und nach den entsprechenden Versuchszeiten die FSR und die Ausbildung einer EAO verglichen. Grundsätzlich läßt sich sagen, daß alle mit den bakteriellen Toxinen (*Mycobacterium tuberculosis* und *Bordetella pertussis*) injizierten Tiere beider Stämme (Lewis und Wistar) eine FSR entwickelten. Diese FSR konnte nicht direkt mit einer EAO korreliert werden und somit als evtl. Marker für eine bereits ausgebildete EAO herangezogen werden. D.h. in den Gruppen der mit Toxin behandelten Tiere entwickelten sich FSRs schon nach 25 Tagen zu 100%. EAOs wurden jedoch erst ab dem 50. Tag nach Behandlung detektiert (Lewis 25% und Wistar

75%), die sich bis zum Tag 80 nach Behandlung auf eine EAO-Rate bei den Lewis Ratten auf 25% hielten und bei den Wistar Ratten auf 100% erhöhte. Ein etwas anderes Bild zeigte sich in der Gruppe der Tiere, die nicht mit den bakteriellen Toxinen behandelt wurden, sondern nur mit dem HH und dem GERBU-Adjuvant 100. Die Gruppe der Lewis-Ratten zeigte zu allen Zeitpunkten keine FSR und nur in der Gruppe der 25 Tage Tiere eine EAO-Rate von 25%. Die Wistar-Ratten zeigten eine FSR von 50% 35 Tage nach Behandlung, 25% 50 Tage nach Behandlung und 0% 80 Tage nach Behandlung. Die EAO-positiven Hoden hatten 80 Tage nach Behandlung einen Anteil von 75% in der Gruppe der Wistar Ratten. So sagt die FSR generell relativ viel darüber aus, ob die entsprechende Aktivierung zu einer EAO-Induktion führen kann. Die speziellen Versuchsbedingungen entscheiden dann über die zeitliche Korrelation von EAO und FSR, und beinhalten u.a. die genetische Prädisposition (siehe 1.4), das Versuchstieralter (Soramoto et al., 1993), die Zusammensetzung der Stimulanzen und bakteriellen Toxine (siehe auch 4.2) in den Adjuvansien (siehe auch 4.3 Dendritische Zellen) und wesentlich die Inkubationszeit.

4.2 Abhängigkeiten der Induktionseffizienzen

Um die normalerweise übliche Selbsttoleranz zu überwinden und eine immunologische Reaktion des Körpers gegen sich selbst, zu induzieren, müssen die Regelmechanismen des Immunsystems außer Kraft gesetzt werden. So entscheidet die Wahl des Adjuvans über die Induktion der unterschiedlichen T-Zellwege T_H1 oder T_H2 . Das häufig verwendete Freund's Adjuvans induziert in seiner inkompletten Form eine T_H2 Antwort, während die komplette Form dieses Adjuvanses eine T_H1 Antwort induziert, die für eine langanhaltende zelluläre Immunantwort verantwortlich gemacht wird (Shibaki et al., 2002). Wobei bei der Entscheidung zugunsten der T_H1 - oder T_H2 -Antwort das Priming der DCs eine erhebliche Rolle spielt. Diese können durch ein entsprechendes Umfeld eine T_H2 Entscheidung bewirken, was eine Krankheitsentwicklung verhindert (Vasu et al., 2003). Auch Makrophagen können die vermittelnde Rolle über die Hochregulation von CD80 (B7) und die Induktion einer T_H1 -Antwort übernehmen (Sonoda et al., 1997). Durch die Wahl des geeigneten Adjuvans (Bordetella pertussis) können genetisch weniger empfängliche Tiere zu einer T_H1 -Antwort und damit einer EAO-Entwicklung gebracht werden (Teuscher et al. 1989, de Jong et al. 2002). In diesem Projekt wurde zur Verbesserung der Induktionseffizienz ebenfalls die Wirkung von Bordetella pertussis mit Erfolg eingesetzt. Zusätzlich wurde mit dem Einsatz von Mycobakterium tuberculosis eine T_H2 -Antwort ausgelöst (Hou et al., 2003). Die Stimulation beider Wege scheint für die Induktion der EAO von Vor-

teil zu sein (siehe auch 1.4). In den initialen Versuchen wurden Wistar Ratten mit einem handelsüblichen Adjuvans (GERBU) und 100mg Hodenhomogenat pro Tier immunisiert und Induktionseffizienzen von nur 25% erreicht. Die Erhöhung der Hodenhomogenat-Dosis auf 200mg pro Tier führte zu einer Verringerung der Erfolgsrate. Dieses Ergebnis könnte durch eine Anergie der T-Zellen entstanden sein. Nichtbakterielle syngene Proteinantigene, wie es das Hodenhomogenat in diesem Versuchsansatz ist, werden von Makrophagen endozytiert und den T-Zellen präsentiert, aber durch die fehlende Aktivierung der Makrophagen, bedingt durch die fehlende Expression des Co-stimulierenden Moleküls B7 eine anergische Reaktion einleiten. Die Aktivierung durch Dendritische Zellen, die zwar selbst große Mengen an Co-stimulierenden Molekülen (B7 und ICAMs) exprimieren, könnte durch die verminderte aktive Antigen-Aufnahme dieser Zellen oder durch die geringe Zellzahl an DCs an den Injektionsstellen, sowie das spezielle Cytokinmuster und die für den Hoden typische T-Zellbalance, reduziert sein. Um die Anergie der T-Zellen zu umgehen, wurden den Injektionslösungen wie unter 2.2.1.3 beschrieben, die bakteriellen Adjuvansien *Mycobakterium tuberculosis* und *Bordetella pertussis* beigemischt und so eine Induktionsrate von 100% nach 80 Tagen Versuchszeit bei den Wistar Ratten (Inzucht) erzielt. Das Ergebnis von Teuscher konnte bestätigt werden, eine fehlende genetischen Prädisposition kann mit dem entsprechenden bakteriellen Adjuvans umgangen werden.

4.3 Immunzellen im Hoden

Für die immunprivilegierte Stellung des Hodens, ist u.a. die Balance der Immunzellsubpopulationen verantwortlich. Veränderungen dieser Subpopulationen sollten mit immunhistochemischen Methoden erfaßt und anschließend quantifiziert werden.

4.3.1 Makrophagen

Testikuläre Makrophagen synthetisieren unterschiedliche Wachstums- und Differenzierungsfaktoren (siehe auch 4.4) und stehen u.a. dadurch in engem Kontakt mit den Leydig-Zellen (Hales et al., 1999). Im entwickelnden Hoden sind zunächst nur wenige residente Makrophagen zu finden, doch mit dem Beginn der Differenzierung und der Leydig-Zell-Besiedlung steigt die Zahl der Hoden-Makrophagen rapide an (Mendis-Handagama et al. 1987; Hardy et al., 1989; Raburn et al., 1993). Die enge räumliche Beziehung der Makrophagen und Leydig-Zellen wird durch sogenannte Interdigitationen deutlich (Miller et al., 1983; Hutson 1994; Christensen et al., 1969). Es bestehen jedoch nicht nur direkte zelluläre Kontakte, sondern auch ein enges parakri-

nes Zusammenspiel dieser Zellarten (Lukyanenko et al., 2002). Von Makrophagen sezernierte Cytokine (IL-1 und TNF) inhibieren die Leydig-Zell-Steroidogenese (Hales et al., 2002) (siehe auch 4.4). Hales sieht in diesem Zusammenspiel ein Umschalten von einem „gesunden Testosteronverhalten“, zu einem „kranken Verhalten“ des betroffenen Individuums. Aber auch andere Faktoren sind am Erhalt der Makrophagenpopulation beteiligt (Hedger 1997). Diese beinhalten lokal produzierte Cytokine (Gerhard et al., 1991) und die hypophysären Hormone GH und FSH (Gaytan et al. 1994; Yee and Hutson, 1993). Auch dem Cytokin MIF wird eine regulative Funktion bei der Aufrechterhaltung der Makrophagenpopulation zugeschrieben (Meinhardt et al., 1998).

Die Hodenzellmakrophagen sind nicht als homogene Zellpopulation zu sehen (Wang et al. 1994). Sie durchlaufen einen gewissen „Reifungsprozess“ in dem sie von den typischen pro-inflammatorischen, zirkulierenden monozytären Makrophagen, charakterisiert durch die Marker ED1(+) (CD68), über die Zwischenstufe ED1(+) ED2(+), zur residenten Population (ED1(-) ED2(+)) werden, die schließlich 85% der Hodenmakrophagen stellen. Dies führt durch eine funktionelle Umwandlung zu einer vornehmlich homöostatischen Funktion der Zellen. Residente Makrophagen exprimieren weiterhin MHCII und sind dadurch in der Lage mit CD4(+) T-Zellen zu kommunizieren (Hedger and Eddy, 1987; Pöllänen and Niemi 1987; Tung et al., 1987). Sie sezernieren aber ein verändertes Cytokinprofil, welches möglicherweise Einfluß nimmt auf die Co-Stimulation der T-Zellen (Kern et al., 1995; Hayes et al., 1996). Wie unter Abbildung 32 und 33 gezeigt, konnte in den EAO-Hoden eine Erhöhung der ED1(+) Zellzahl gezeigt werden. Interessanterweise wird auch in den Hoden von infertilen Männern eine Zunahme der ED1(+) Makrophagenzahlen gefunden (Frungieri et al., 2002). Offensichtlich ist die gestörte Balance der Immunzellen Ursache oder Folge der Fertilitätsstörung.

Auch für die ED2(+) Makrophagen zeigten sich signifikante Erhöhungen in den rechten traumatisierten Hoden und Anstiege der Zellzahl in den Hoden der immunisierten Tiere. Ob diese Zellpopulation pro- oder antiinflammatorisch in die Pathogenese der EAO eingreift, konnte nicht eindeutig geklärt werden. Die residenten Makrophagen (ED2) dienen vornehmlich dem Erhalt des speziellen immunprivilegierten Milieus der Hoden, während die „noch“ frisch eingewanderten Makrophagen (ED1) eine entzündliche Antwort forcieren können (Hedger et al., 2002). Die Veränderung der Cytokinprofile, die in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, korreliert gut mit der Zunahme der Anzahl beider Makrophagenpopulationen, wobei man den ED1(+)-Zellen vornehmend die Expression der pro-inflammatorischen Cytokine MCP-1, IL-1 und TNF- α und den ED2(+) Makrophagen die Synthese der anti-inflammatorischen Cytokine IL-

10 und TGF- β zuweisen kann (siehe auch 4.4.).

4.3.2 T-Zellen

Eine weitere für die EAO wesentliche Zellgruppe sind die T-Zellen. Diese Zellen unterscheiden sich durch das unterschiedliche Expressionsmuster ihrer Oberflächenrezeptoren. Man unterscheidet CD4(+)-Zellen und CD8(+)-Zellen, denen die Expression des T-Zell-Rezeptors (TCR) vom α/β -Typ gemeinsam ist. Eine weitere kleinere Gruppe sind die Zellen, die weder CD4, noch CD8 exprimieren und sich durch einen TCR des γ/δ -Typs auszeichnen. Die kleine Gruppe erscheint sowohl onto- als auch phylogenetisch früh, wird als relativ unspezifische Zellart beschrieben und häufig in Verbindung mit Autoimmunreaktionen gefunden (siehe auch 4.6). Bakterielle Epitope, sind nicht wie man lange vermutet hat (O'Brien et al., 1989; Modlin et al., 1989 und Pfeffer et al. 1990, Mukasa et al., 1995, Mukasa et al., 1997, Mukasa et al., 1998) für die Aktivierung dieser Subpopulation verantwortlich, sondern viel mehr ein endogenes Antigen, ein Hitzeschockprotein (Mukasa et al., 1999; Martin et al., 2003; Zeine et al., 1998; Bonorino et al., 1998; Belles et al., 1999; Ichinohe et al., 2003). In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das B-Zell-Äquivalent der γ/δ -T-Zellen, CD5 differenziell exprimiert wird (siehe auch 4.6).

Eine Subpopulation der α/β -T-Zellen, sind die CD4(+) T-Zellen. Diese Zellen koordinieren die Immunantwort gegen intrazelluläre Bakterien und Parasiten und brauchen für die vollständige Stimulation neben den entsprechenden Cytokinen auch die entsprechenden Co-Stimulationen durch MHC II Moleküle präsentierende Zellen. Die CD4(+) T-Zellen wurden auf Grund ihrer sie aktivierenden Cytokinmuster und Zellen, bzw. die Folgen dieser Aktivierung, in zwei Gruppen eingeteilt, die mit T_H1 und T_H2 gekennzeichnet werden. Die Gruppe der T_H1 Zellen werden auch inflammatorische T-Zellen genannt, sie führen zu einer Makrophagenaktivierung. Die beteiligten Cytokine sind hier u.a. IL-1, IL-2, IL-8, TNF- β und MCP-1. Die Erhöhung der Makrophagenzahl (ED1 und ED2) sowie der anderer inflammatorisch wirksamer Zellen (siehe auch Tabelle 4) und die Hochregulation der entsprechenden Cytokine (siehe auch 4.4), zeigen, dass die T_H1 -Zellen der CD4(+)-Zellpopulation an der Pathogenese der EAO beteiligt sind.

Dagegen wirken Cytokine wie IL-10, IL-6, TGF- β und TNF- α stimulierend auf die T_H2 -Zellen. Diese Zellen sind auf die Aktivierung der B-Zellen und somit auf die Ausbildung einer humoralen Immunantwort spezialisiert. Antigenspezifische B-Zellen, die das Antigen über ihren membrangebundenen Antikörper internalisieren, prozessieren und mit ihrem MHC II Molekül präsentieren, lösen zusammen mit den CD4(+) Zellen vom T_H2 -Typ die Immunantwort aus. Die in dieser Arbeit nachgewiesenen Autoantikörper (siehe auch 4.7) und die veränderte Cytokinexpression (siehe auch 4.4) weisen auf eine Beteiligung dieser Zellen an der Pathogenese der

EAO hin. CD4(+)-Zellen sind (siehe auch Abbildungen 25 und 26) während der Pathogenese der EAO quantitativ stark erhöht. In der homogenen Gruppe der stichtraumatisierten Hoden, die zu 100% mit einer moderaten Infiltration von Immunzellen reagierte, konnte eine signifikante Erhöhung der CD4(+)-Zellen errechnet werden. In der inhomogeneren Gruppe der immunisierten Tiere zeigt sich die CD4(+)-Zell-Infiltration besonders deutlich 80 Tage nach Immunisierung.

Eine weitere Subpopulation der CD4(+) Zellen sind Suppressor-Zellen, die ihre Funktion u.a. über die Cytokine IL-10 und TGF- β vermitteln (siehe auch 4.4), die in der EAO erhöht vorliegen. Diesen zuerst im Seminalplasma gefundenen Zellen wird eine Kontrollposition in der Regulation der Immunantwort zugesprochen (Groux et al., 2003). In der Gesamtpopulation der CD4(+) Zellen ist folglich auch diese Subpopulation der Regulator- bzw. Suppressorzellen zu berücksichtigen. Dies könnte möglicherweise ein Erklärungsansatz für die z.T. geringen Responderraten in unserem Modell sein.

Die CD8(+) Zellen bilden die zweite große Gruppe der α/β -T-Zellen, die zusammen mit der Population der residenten Makrophagen (ED2) für die Aufrechterhaltung der speziellen Immunsituation (gute Protektion gegen virale und onkogene Störungen und verminderte Reaktionen der antigenspezifischen zellulären Immunantwort) verantwortlich gemacht wird (Tompkins et al., 1998; Hedger et al., 1998a, und 2000). Im Hoden dominiert diese T-Zell-Subpopulation quantitativ über die CD4(+) T-Zellen, im Gegensatz zu anderen Organen (siehe auch Abbildung 31). Die CD8(+) Zellen sind in der Lage mit den MHC I Molekülen, die auf fast allen Körperzellen exprimiert werden, zu interagieren. MHC I negative Zellen sind z.B. Zellen des Keimepithels (Pöllänen and Niemi, 1987). Diese CD8/MHC I Interaktion bedarf keiner weiteren Zellen und durch die Co-Expression der benötigten Stimuli (Fas und Fas-Ligand, verschiedene Cytotoxine wie Perforin-1 oder Cytokine wie IFN- γ oder TNF- α) kommt es zur Apoptose der entsprechenden Zielzelle. Bei der fälschlicherweise Erkennung eines körpereigenen Epitops, führt dies zu einer Zerstörung der betreffenden Zellen und zur möglichen Initiation einer Autoimmunkrankheit. Auch diese Zellpopulation ist inhomogen und besteht nicht nur aus diesen aggressiven cytotoxischen-T-Zellen (CTLs), sondern auch Suppressor-T-Zellen, deren Anteil an der Regulation der Immunantwort erst unzureichend aufgeklärt ist. Bekannt ist, daß diese Suppressorzellen aus drei Gruppen bestehen. Die ersten beiden Gruppen (1 und 2) werden durch die Markerkombination CD8 und CD28 gekennzeichnet. Die Gruppe 1 vermittelt ihre Wirkung über einen Zell-Zell-Kontakt mit Dendritischen Zellen. Die Gruppe 2 sezerniert die Cytokine IFN- γ und IL-6 und die Gruppe 3 wirkt über eine IL-10-Ausschüttung supprimierend. Die Cy-

tokine TNF- α und IL-10 konnten in dieser Arbeit im Verlauf der EAO als erhöht exprimiert gezeigt werden (siehe auch 4.4). Alle diese Subpopulationen sind in dieser Arbeit als CD8(+) Zellen subsummiert (siehe Abbildung 27 und 28). In den primär traumatisierten Hoden war die Erhöhung der Zellzahl 80 Tage nach Behandlung signifikant. Auch in den linken nicht primär traumatisierten Hoden zeigte sich eine leichte Erhöhung dieser Zellzahlen 80 Tage nach Behandlung. In der Gruppe der immunisierten Tiere zeigte sich ebenfalls eine erhöhte Zellzahl der CD8(+)-T-Zellen 80 Tage nach Behandlung.

Die Balance zwischen CD4 und CD8 Zellen ist nicht nur wichtig für die normale Hodenfunktion, sondern auch für die Pathogenese der EAO (Doncel et al., 1991). In diesem Projekt konnte nicht nur eine Erhöhung der CD4-T-Zellen und der CD8-T-Zellen, sondern zusätzlich die Verschiebung der Balance dieser beiden Zellarten im Hoden während der Pathogenese der EAO nachgewiesen werden. Beide Zellarten erhöhten sich quantitativ signifikant in den primär traumatisierten rechten Hoden. Auch in den Hoden der immunisierten Tiere waren beide Zellarten vermehrt zu finden. Auffällig ist jedoch eine CD4-Zell-Dominanz in der Gruppe der immunisierten Tiere 80 Tage nach Behandlung, normal ist eine CD8-Zell-Dominanz, wie in den Kontrolltieren gezeigt (siehe auch Abbildung 31). Dieses Ergebnis steht im Einklang mit der Arbeit von Doncel et al., 1991, der die Suppression der EAO-Entwicklung der CD8(+)-Zell-Dominanz zuschreibt. So scheint dieser *Switch* nötig zu sein, um die Balance der Immunregulation aus dem Gleichgewicht zu bringen und eine EAO-Induzierbarkeit herbeizuführen.

Dies trifft für die Entzündungsreaktion, die durch die Stichtraumatisierung ausgelöst wird, nicht zu. Bei dieser Art der EAO-Induktion steigt die Anzahl der CD8(+) Zellen stärker an, als die der CD4(+) Zellen. Durch die unterschiedlichen Induktionsarten werden andere Entzündungsreaktionen ausgelöst, d.h. durch die alleinige Zerstörung der Hodenstrukturen, erfolgt keine Umkehr der CD4/CD8-Balance. Erst die Präsentation der vormalis durch die Sequestration geschützten Antigene und die Stimulation des Immunsystems durch geeignete Adjuvansien, führt, bei entsprechender genetischen Prädisposition, zu einer derartigen Verschiebung der CD4/CD8-Balance. Diese Daten zeigen, daß eine veränderte CD4/CD8-Zell-Balance, ausgelöst durch Vermehrung der CD4(+)-T-Zellen, Grundlage zur Entwicklung einer EAO ist (Srivastava 2000; Wan et al., 2003). Sie wird durch exogene Adjuvansien (bakterielle Epitope) und/oder endogenen Adjuvansien (Cytokine, heat shock Proteine) stimuliert. Wobei in diesem Model gezeigt werden konnte, daß der CD8/CD4-*switch* nicht der Induktion durch Bordetella pertussis unterliegt, wie von Doncel (1991) proklamiert. In der Versuchsreihe I konnte gezeigt werden, dass dieser *Switch* auch ohne Bakterien zu erzielen ist.

In diesem Projekt konnte erstmals gezeigt werden, daß sich die CD4-, CD8- und TCR-positiven Zellen über die Versuchszeit, also mit zunehmendem Alter, akkumulieren. Diese Akkumulation im Alter basiert möglicherweise auf der verminderten Testosteronproduktion der Leydig-Zellen (Luo et al., 2001). So können die veränderten Immunzellpopulationen, die verminderte Testosteronproduktion und eine beeinträchtigte Blut-Hoden-Schranke, nicht nur zur verminderten Effizienz der Keimzellproduktion, sondern auch einer veränderten Induzierbarkeit der EAO in unterschiedlichen Alterstufen führen (Levy et al., 1999, Soramoto et al., 1993 und Itho et al., 1994).

4.3.3 Dendritische Zellen (DCs)

Dendritische Zellen werden zu den effektivsten der professionell Antigen präsentierenden Zellen gezählt. Sie initiieren und regulieren die B- und T-Zellantworten über die Expression der benötigten Co-stimulierenden Moleküle. Die Dendritischen Zellen können mehr als nur die Immunantwort forcieren; sie können auch die Antwort des Immunsystems unterdrücken, wenn sie autoreaktive T-Zellen zur Toleranz bringen (Yao et al., 2003). Sie können zwischen *selbst* und *nicht selbst* unterscheiden (Moser, 2003). DCs haben eine entscheidende Rolle bei der Regulation der CD4(+) und CD8(+) Zellen und der Wegbereitung einer Toleranzentwicklung. Außerdem besitzen sie eine große Bedeutung für die Therapie von Autoimmunkrankheiten (Kuwana 2002). Dabei wirken CD4(+)CD25(+) T-Zellen selbst an der Herabregulation ihrer T_H1-Antwort mit, in dem sie mit den DCs einen negativen Rückkopplungskreislauf einleiten (Oldenhove et al. 2003). Die Interaktion der CD25(+)CD4(+) mit den DCs wird durch IL-2 und direkte Zell-Zell-Interaktion über B7 als Co-Stimulanz vermittelt (Yamazaki et al., 2003). In diesem Projekt konnte in den EAO-Hoden eine erhöhte CD25-Expression in den granulomatösen Entzündungszentren immunhistologisch dargestellt werden (siehe Abbildung 38).

Eine Subpopulation der DCs (CD8 (-) CD4 (+)) ist sogar in der Lage eine effektive Suppression bei ausgelöster experimenteller Autoimmun Encephalitis (EAE) zu unterstützen (Legge et al., 2002). Nicht nur ein bestimmter Zelltyp, sondern auch ein bestimmter „Reifegrad“ der DCs entscheidet über die Richtung der Immunantwort (T_H1 oder T_H2) (Zhang et al., 2002). Nur komplett mature DCs sind in der Lage die Differenzierung der T-Zellen in eine T_H2 Antwort zu leiten und damit eine aggressive T-Zellantwort zu verhindern. Genauso entscheidend für das Priming und die Entwicklung zu T_H1 oder T_H2 ist das Cytokinprofil. So induzieren von Mycobakterien stimulierte DCs ein T_H2-Cytokinprofil (IL-2, IL-10, IFN- γ) bei CD4(+) und CD8(+) T-Zellen (Cheadle et al., 2003; Straw et al., 2003, Zhang et al., 2003). In diesem Projekt konnte

zum ersten Mal die Population der DC's mit dem Marker Ox62 im Hoden nachgewiesen werden. Diese Population ist nur mit geringer Anzahl im Interstitium des gesunden Hodens vertreten. In den granulomartösen Strukturen der EAO(+) Hoden, aus der Gruppe der immunisierten Tiere 80 Tage nach Behandlung, sind diese Zellen um 430% erhöht quantifiziert worden. Alle anderen Versuchsgruppen zeigten keinen Anstieg dieser Zellpopulation. So scheint eine Präsentation der Ag, durch Traumatisierung keinerlei Stimulation der DCs zu bewirken. Die DCs benötigen eine adäquate Co-Stimulation, um die Selbstantigene als fremd einzustufen, Adjuvans alleine oder freigelegte Hodenantigene alleine genügen nicht zur Stimulation der DCs. Wobei auch in dem Versuchsansatz ohne zusätzliche bakterielle Epitope (nur GERBU Adjuvans) dieser Zellzahlanstieg um 430% erzielt werden konnte.

Wenn die Makrophagen als APC die Immunreaktion initiieren, so hat dies eine T_H2 -Antwort zur Folge (Hickman et al., 2002). Diese Art der Immunantwort spiegelt sich im Traumatisierungsmodell durch eine Erhöhung der Makrophagenanzahlen im Hoden und im Autoantikörpertiter wieder (siehe Abbildungen 32 bis 35 und 40). In der Gruppe der immunisierten Tiere sind sowohl die DCs als auch die Makrophagen erhöht zu finden. Dies spricht für eine Rekrutierung der Makrophagen und der DCs als APCs, wodurch sich die Antwort beider Muster, T_H1 und T_H2 , d.h. zelluläre Infiltrationen und Autoantikörper, in dieser Gruppe erklären läßt. Beide Antwortmuster scheinen sich gegenseitig zu stimulieren.

4.3.4 Mastzellen (MZ)

Eine weitere Zellgruppe des immunprivilegierten Kompartiments des Hodens sind die Mastzellen. Die Mastzellreifung und deren Lebensdauer ist abhängig vom Stem Cell Faktor (SCF) (Tsai et al., 1991a+b; Kirschenbaum et al., 1992; Metcalfe et al., 1997). Im Hoden wird SCF von Sertoli-Zellen sezerniert und dient als Ligand des von Spermatogonien exprimierten Protoonkogens c-kit (Strohmeyer et al., 1995; Sandlow et al., 1996). Reguliert wird dieses System von dem hypophysären Hormon FSH und spielt beim Differenzierungsprozess der Spermatogonien eine wichtige Rolle (Rossi et al., 1993). Auch die Testosteronkonzentration im Hoden ist, gekoppelt durch das androgenbindende Protein (ABP), FSH-reguliert und bei entzündlichen Geschehen im Hoden als gestört beschrieben. SCF ist ein möglicher Verknüpfungspunkt, der diese beiden Systeme verbindet. Durch die erhöhte FSH-Ausschüttung, parallel zu LH, wird vermehrt ABP bereitgestellt, das zu einer Kompensation des Testosterondefizites führen soll. Dieser FSH-gesteuerte Regelmechanismus fördert so auch die SCF-Sekretion und damit eine Mastzellakkumulation. Die zweite Vernetzung der Mastzellen in diesem Regelkreis ist ein

Mastzell-inhibierender Leydig-Zell-abhängiger Faktor im Hodeninterstitium. Eine Mastzellakkumulation erfolgt nach einer Leydig-Zell-Depletion mit Ethylen Dimethan Sulphonat (EDS), wobei in neonatalen Ratten eine Östrogenbehandlung die gleichen Auswirkungen hat (Gaytan et al. 1990; 1989). Mastzellen werden in kleinen Gruppen parakapillär unter der Hodenkapsel bei gesunden Nagern gefunden. In infiltrativen Entzündungen konnten Mastzellen in direkter Nachbarschaft zu T-Zellen gefunden werden. In Zellkultur führt dies zur Degranulation und Freisetzung von Histamin, TNF- α u.a. (Bhattacharyya et al., 1998). Eine erhöhte TNF- α Expression konnte auch in diesem Projekt an den EAO-Hoden gezeigt werden (siehe Abbildung 49). Die Mastzellen sezernieren leukotaktische Substanzen und vasoaktive Amine (Hedger, 1997). Sie sind aber ebenso in der Lage Bakterien zu phagozytieren und deren Epitope über MHC II-Moleküle T-Zellen zu präsentieren (Feger et al., 2002). Mit dem entsprechenden Cytokinmuster führt dies präferentiell zu einer T_H2-Reaktion der entsprechenden T-Zellen (Mekori et al., 1999; Skokos et al., 2003). Entsprechende Cytokine (siehe auch 4.4) und Autoantikörper (siehe auch 4.7) konnten auch in diesem Projekt gezeigt werden.

Pathogen- oder antigene assoziiert mit immunogenen Komponenten (*heat shock* Proteinen 60- und 70- kDa) in Mastzellexosomen, haben großen Einfluß auf die Mastzellaktivierung (Skokos et al., 2003); (siehe auch 4.8.). Da MZ auch an Entzündungsreaktionen wie der rheumatoiden Arthritis, der interstitiellen Cystitis, Scleroderma und Morbus Crohn beteiligt sind (Krishnaswamy et al. 2001), ist es sehr wahrscheinlich, dass diese Zellen bei Autoimmunkrankheiten eine wichtige Rolle spielen.

Gewebsstrukturen wie Tubuliwände, bzw. deren Basalmembranen sind wichtige Strukturen für die Integrität der Hodenfunktion. Interaktionen der Mastzellen mit den Tubuliwänden konnten in verschiedenen Arbeiten gezeigt werden. Diese Veränderungen sind assoziiert mit schweren Funktionsstörungen wie Cryptorchismus und Autoimmun-Orchitis. Bei diesen Hodenfunktionsstörungen wurden Verdickungen der Basalmembranen festgestellt, die auf die vermehrte Expression von Laminin, Collagen IV und Heparansulfatproteoglycan zurückgeführt wird (Richardson et al., 1998). Diese die Membranen verdickenden Substanzen werden beim Sertoli-Zell-Only-Syndrom von Sertoli-Zellen sezerniert (Pollanen et al., 1985), die MZ-Zahl und der Grad der Tubuliwandverdickung korrelieren positiv. Die Mastzellprodukte Fibroblast Growth Factor (FGF) und Tryptase sind beteiligt an der Verdickung der Tubuluswand und möglicherweise weiteren pathologischen Veränderungen im Hoden infertiler Männer (Meineke et al. 2000). Auch in diesem Projekt konnten Tubuluswandverdickungen in Hoden beider EAO-Modelle gezeigt werden (siehe Abbildung 20), die auch hier auf die ebenfalls gezeigte Mastzellak-

kumulation zurückgeführt werden (siehe Abbildung 21). Die Schlußfolgerung für dieses Projekt ist, dass durch die entzündungsbedingte verminderte Leydigzellfunktion über die bereits beschriebenen Regelmechanismen, die SCF-Sekretion erhöht wird und dadurch eine Mastzellakkumulation ausgelöst wird, die eine Erhöhung der Sekrete dieser Zellen zur Folge hat. Diese pathologisch erhöhten Sekrete (FGF und Tryptase) führen dann durch den Umbau von Laminin, Collagen IV und Heparansulfatproteoglycan zu einer Tubuliwandverdickung.

4.3.5 MHC II, CD25 und Ki67

Die Kommunikation der Immunzellen, die Erkennung von *Selbst* und *Nicht Selbst* und die Präsentation von Antigenen werden mit Hilfe des *major histocompatibility complex (MHC)* abgewickelt. Dieser Komplex wird auch Haupt Histokompatibilitäts Komplex genannt und seine große Variabilität beruht auf dem sehr stark ausgeprägten Polymorphismus seines Genclusters. Fast alle Zellen des Körpers (bis auf einige Zellen im Gehirn, den roten Blutkörperchen und dem Keimepithel des Hodens) exprimieren die MHC I Moleküle, die die Interaktion mit den CD8(+)-Zellen ermöglicht (Pollanen et al., 1992). Das MHC II Molekül wird überwiegend von immunkompetenten antigenpräsentierenden Zellen (APCs) exprimiert und ermöglicht diesen die Interaktion mit CD4(+)-Zellen. Die Entwicklung der EAO ist Gewebe- und MHC-spezifisch (Wekerle et al., 1978). Die MHC II Expression steigt nur in EAO positiven Hoden an (Lustig et al., 1993). Vorläufige Ergebnisse in diesem Projekt konnten diese MHC II-Verteilungen bestätigen. Ein weiteres Merkmal für die Aktivierung der an der EAO-Induktion beteiligten Zellen, ist die Expression des als **CD25** definierten IL-2-Rezeptors. Die CD25-Expression zeigte sich nur in den granulären Strukturen der EAO(+) Hoden (siehe Abbildung 38). T-Zellen exprimieren den IL-2-Rezeptor (CD25) im Rahmen ihrer Aktivierung. Die fehlende Expression des Proliferationsmarkers **Ki67** in den EAO(+) Hoden zeigt, daß Migration eher als Proliferation für die Zunahme der Leukozyten im Hoden während der EAO verantwortlich ist. Während der Immunisierungsphase steigen zunächst die Zellzahlen der Lymphozytenpopulationen (CD4(+), CD8(+) und MHC II(+)) in den regionlen Lymphknoten an, bevor sie anschließen in die Hoden migrieren (Doncel et al., 1991; Lustig et al., 1993).

4.4 Pathophysiologie der Cytokine im Hoden

Cytokine, die Botenstoffe des Immunsystems, zeigen außer ihrer regulatorischen Funktionen des Immunsystems viele weitere biologische Aktivitäten. Zwei Aufgaben lassen sich für die Cytokine im Hoden klassifizieren. Erstens fungieren sie als Mediatoren bei pathophysiologischen Reaktionen im Immunsystem, und zudem wirken sie als Wachstums- und Differenzie-

rungsfaktoren während der Entwicklung und den normalen Funktionen des adulten Hodens (Hales et al., 1999).

4.4.1 MCP-1 ein pro-inflamatorischer Faktor in der Pathogenese der EAO

Chemokine werden in zwei Gruppen unterteilt: Die α -Chemokine, die beim Menschen sämtlich in einem Cluster auf dem Chromosom 4 codiert sind und auf Neutrophile Granulozyten Einfluß nehmen. Sowie die β -Chemokine, deren Wirkung sich hauptsächlich auf Monocyten überträgt und die in einem Cluster auf dem Chromosom 17 codiert liegen. Einige der Chemokine gehören zu der Gruppe der Monokine. Dies sind kleine Polypeptide, die von Makrophagen, Endothelzellen, Keratinozyten der Haut, Fibroblasten und glatten Muskelzellen der Bindegewebe produziert werden. Alle Chemokine weisen ähnliche Sequenzen auf und ihre dreidimensionale Struktur ähnelt der der antigenbindenden Domänen der HLA-Moleküle (MHC). Chemokine sind Lockstoffe für phagozytierende Zellen, sie veranlassen die Migration der Makrophagen und Monozyten aus dem Blut in die entzündeten Gewebe. Ein β -Chemokin ist das „human macrophage chemoattractant and activating factor“ MACF oder auch „monocyte chemoattractant protein-1“ MCP-1 genannt. Es wird üblicherweise von Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Keratinozyten sezerniert und wirkt als chemotaktischer Faktor für T-Gedächtniszellen und Monozyten und aktiviert die letzteren. Stimulierte Dendritischen Zellen sezernieren nicht nur MCP-1, sondern exprimieren auch dessen Rezeptor (Zhu et al., 2000). Virusinfizierte Maushoden sezernieren MCP-1 in Leydig-Zellen und Peritubulär Zellen (Le Goffic et al., 2002). Gesunde Hoden verfügen über eine basale Expression des Chemokins MCP-1 (Gerdprasert et al., 2002). In dieser Arbeit ist es gelungen, MCP-1 in interstitiellen Makrophagen und Leydigzellen unbehandelter Hoden und EAO(+) Hoden nachzuweisen. Da bei unserem Model die Hodenmorphologie zum Teil völlig zerstört ist, war es ausgeschlossen, zu erkennen, ob die Peritubulärzellen oder Perivaskulärzellen auch für dieses Chemokin positiv sind, da diese Zellen besonders in den Granulomen nicht mehr identifiziert werden können. Dieses Chemokin kann also sowohl im Rahmen der EAO bei der Phagozytenrekrutierung als auch bei der Aufrechterhaltung der Makrophagenpopulation im gesunden Hoden beteiligt sein.

4.4.2 TGF- β mehr als nur ein Klassenwechsel ?

Der Transformierende Wachstumsfaktor beta (TGF- β) gehört zu den typischen T-Zell-Cytokinen (T_H2 -Cytokin) und wird neben vielen anderen Zellen auch von Makrophagen sezerniert. Sein Wirkungsspektrum ist sehr breit und je nach Zielzelle inhibierend oder stimulierend. So aktiviert es aus der Reihe der hämatopoetischen Zellen die neutrophilen Granulozyten, inhibiert jedoch die Aktivierung von Makrophagen. Auf die B-Zellen wirkt es wachstumshemmend, in-

itiert aber dort den Klassenwechsel von IgM und IgD zu IgG2b und IgA. TGF- β 1-defiziente Mäuse sterben 20 Tage nach der Geburt, begleitet von multifocalen Entzündungen, Zellinfiltrationen und Gewebnekrosen (Shull et al., 1992). Im Hoden wird TGF- β u.a. von Sertoli-Zellen exprimiert. Dem Faktor wird zudem eine wichtige Rolle bei der parakinen Interaktion von Sertoli-Zellen und Keimzellen zugeschrieben (Avallet et al., 1997). So konnte die selbe Arbeitsgruppe zeigen, daß Sertoli-Zellen zweifach mehr TGF- β produzieren, wenn sie mit Spermatozyten und frühen Spermatiden kokultiviert wurden. In der Hodenentwicklung wird TGF- β schon früh exprimiert (Gautier et al., 1994). TGF- β inhibiert die Steroidogenese der Leydig-Zellen und reduziert die Anzahl der Gonozyten im fetalen Hoden in vitro (Gautier et al., 1997). Auch die Verteilung der TGF- β -Rezeptoren auf Sertoli-Zellen und Keimzellen unterstützt die Rolle dieses Cytokins in der Hodenfunktion und somit der reproduktiven Leistung dieses Organs. Die Studien zur TGF- β -Lokalisation im Hoden sind sehr widersprüchlich. TGF- β konnte im Rattenhoden in Sertoli-Zellen, Leydig-Zellen und Spermatogonien Typ A gefunden werden (Olaso et al., 1997). In dieser Arbeit konnte TGF- β in den Kontrollhoden ebenfalls in Makrophagen, Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen und Spermatogonien Typ A detektiert werden. In den EAO-Hoden wurden qualitativ und quantitativ verstärkte Expressionen dieser Zellen (Makrophagen und Leydig-Zellen und an basalen Tubuliresten Spermatogonien Typ A) detektiert. Die duale Rolle von TGF- β im Hoden wird deutlich durch die Untersuchungen von Pöllänen et al. (1993), der eine generell immunsuppressive Wirkung im Hoden nachweisen konnte, während Lui et al. (2003) aufzeigen konnten, daß TGF- β im Hoden Einfluß auf die Blut-Hoden-Schranke nimmt und deren Stabilität über einen TGF-beta3/p38 Map Kinase Signalweg verändert. Die Integrität dieser Schranke wird durch ansteigende Konzentrationen von TGF- β im Hoden verringert. Diese verstärkte Expression von TGF- β in den Orchitishoden kann somit zu einer Öffnung der Blut-Hoden-Schranke mit nachfolgendem freien Zugang des Immunsystems zu den vorher sequestrierten Keimzellen führen.

Zusammenfassend kann TGF- β dreifach auf die Entwicklung einer EAO Einfluß nehmen. Zum einen spezifiziert es die Antikörperantwort durch den Klassenswitch in den B-Zellen, des weiteren kann es das Absenken der Testosteronproduktion im Hoden induzieren. Und außerdem kann TGF- β Einfluß auf die Permeabilität der Blut-Hode-Schranke nehmen und den Angriff der Immunzellen auf die vorher sequestrierten Keimzellen ermöglichen.

4.4.3 TNF- α Initiator oder nur Verstärker ?

Das 17 kDa große glykosylierte Polypeptid Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α) wird von aktivierten Makrophagen und Monozyten, aber auch T_H1, T_H2 und CTLs sezerniert. Im Hoden

wurde die TNF- α Expression in Keimzellen gezeigt und eine Funktion bei der Regulation der Spermatogenese vermutet (Pentikainen et al., 2001). TNF- α beeinflusst die Keimzellapoptose durch die Regulation der FAS-FASL Moleküle auf den Spermatozyten. In EAO-Hoden ist die Anzahl von TNF- α positiven Makrophagen erhöht, sowie die Testosteronproduktion der Leydig-Zellen verringerte (Suescun et al., 2002). Der TNF- α -Rezeptor ist in fast allen Körperzellen gefunden worden (Cerami et al., 1992). TNF- α selbst stimuliert die Freisetzung von IL-1 und IL-6 in aktivierten Monozyten und Makrophagen. Und TNF- α Synthese und Ausschüttung wird von aktivierten T-Zellen bzw. von sezerniertem INF- γ stimuliert (Spooner et al., 1992).

Bei der Wirkung auf die Leydig-Zell-Steroidogenese zeichnet sich ein kontroverses Bild der veröffentlichten Ergebnisse ab. Warren et al. (1990) zeigten für TNF- α eine stimulierende Wirkung auf die Testosteronproduktion der Leydig-Zellen, die Mehrzahl der Publikationen beschreibt jedoch eine inhibitorische Wirkung von TNF- α auf die Androgensynthese der Leydig-Zellen (Mealy et al., 1990; Meikle et al., 1991; Maudit et al., 1991; Xiong et al., 1993, Maudit et al., 1998 und Li et al., 1995). Eine weitere Wirkung von TNF- α ist die Stimulation der Expression der Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und VCAM-1 in Sertoli-Zellen (Ziparo et al., 1995; Riccioli et al., 1995), was eine erhöhte Bindung von Lymphocyten zur Folge hat. Zudem produzieren die Sertoli-Zellen nach einer TNF- α Stimulation vermehrt IL-6.

Die wichtigste lokale Wirkung von TNF- α ist das Auslösen einer Entzündung (rubor, turgor, dolor). Durch die verbesserte Durchblutung erfolgt eine Erhöhung der Zellzahlen in den betreffenden Geweben und eine erleichterte Diapedese der Zellen aus den Blutgefäßen in die Gewebe. Dies wird unterstützt durch die ebenfalls TNF- α induzierte Expression von ICAM-1 und VCAM-1 auf Epithelzellen der Gefäße.

Die Rolle von TNF- α bei der Pathogenese der EAO wird kontrovers diskutiert (Teuscher et al., 1990; Yule et al., 1993). Teuscher schloß TNF- α aus dem Kreis der für die EAO wichtigen Cytokine aus. Yule konnte zeigen, daß der Schweregrad der EAO signifikant verringert werden kann, wenn die Tiere bei der üblichen EAO Induktion einen neutralisierenden anti-TNF- α -Antikörper injiziert bekamen. In dieser Arbeit konnte eine basale TNF- α -Expression in den interstitiellen Makrophagen der KO-Hoden dargestellt werden. In den EAO(+) Hoden konnte eine erhöhte TNF- α -Aktivität in den Makrophagen des Interstitiums und den Spermatogonien der Tubulireste nachgewiesen werden. Durch seine pleiotrophe Wirkung kann TNF- α auf unterschiedliche Weise Anteil an der Entwicklung der EAO nehmen. Es wirkt lokal durch die Induktion der Entzündung und der damit verbundenen Rekrutierung der Effektorzellen, der Erhöhung der Adhäsionsmolekülexpression ICAM-1 und VICAM-1 und der Stimulation der Cytokinse-

ekretion (IL-1 und IL-6). So induziert es indirekt über die Wirkung von IL-1 und IL-6 die Reduktion der Testosteronsynthese der Leydig-Zellen und führt somit zu einer antiandrogenen Umgebung für die verbesserte Immunantwort (siehe auch 4.4.5). TNF- α wirkt autokrin auf aktivierte Makrophagen und stimuliert so die Expression von MHC II-Molekülen. TNF- α induziert die Bildung von Stickstoff- und Sauerstoffradikalen und wirkt synergistisch mit INF- γ auf die Stimulation von CD4-T-Zellen. Selbst bei der Aktivierung von Mastzellen spielt TNF- α eine Rolle. Erhöhte Expressionen von TNF- α und MHC II, sowie CD4(+)-T-Zellen und Mastzellen konnten in den EAO-Hoden in diesem Projekt dargestellt werden. Aus diesem Grund möchte ich mich dem Standpunkt von Yule et al., 1993 anschließen und TNF- α als ein wichtiges Cytokin in der Pathogenese der EAO definieren. Ob als Initiator oder Verstärker konnte nicht geklärt werden.

4.4.4 Das IL-1 System des Hodens

Interleukin-1 ist ein einkettiges 17kDa großes Glycoprotein und bildet eine Gruppe aus drei Monokinen (IL-1 α , IL-1 β und IL-1Ra (Rezeptor Antagonist)). IL-1 α und IL-1 β wirken agonistisch und binden nicht nur am gleichen Rezeptor, sondern haben eine vergleichbare biologische Wirkung. Der Interleukin-1 Rezeptor Antagonist bindet ebenfalls am IL-1-Rezeptor ohne selbst eine Signaltransduktion zu initiieren. Interleukin-1 als pro-inflammatorisches Cytokin wird üblicherweise von Makrophagen und Monozyten sezerniert, um die Immunantwort auf Fremdartigene zu forcieren. Aber auch andere Zellen wie Fibroblasten und Epithelzellen sezernieren diesen Botenstoff und koordinieren so parakrin und systemisch physiologische und pathophysiologische Prozesse im Körper, zu der die Aktivierung des Gefäßendothels, der Lymphozyten, die Initiierung der Interleukin-6-Produktion in Makrophagen sowie eine pyrogen Wirkung gehören.

Das IL-1 System des Hodens ist neben der Bekämpfung fremder Keime auch an der parakrinen und autokrinen Regulation der Spermatogenese und der Spermiogenese beteiligt (Huleihel et al., 2002). IL-1 β wird sezerniert von Leydig-Zellen (Wang et al., 1991; Cudicini et al., 1997a,b) und von testikulären Makrophagen (Kern et al. 1995). Die alpha Form des IL-1 konnte in Leydig-Zellen und Sertoli-Zellen nachgewiesen werden (Cudicini et al., 1997a,b, Gerard et al., 1991, Stephan et al., 1997 und Wang et al., 1998). Die Interleukin-1 Rezeptoren Typ I und II wurden auf Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen, Peritubulär Zellen, pachytänen Spermatocyten und frühen Spermatiden nachgewiesen (Gomez et al., 1997). Isolierte Sertoli-Zellen aus immaturren Ratten produzieren größere Mengen IL-1 α als vergleichbare Sertoli-Zellen innerhalb des Ho-

dens adulter Tiere sezernieren. Diese Beobachtung spricht für eine autokrine Wirkung von IL-1 α während der Entwicklung (Jegou et al. 1995).

Stimuli für Sertoli-Zellen zur Produktion von IL-1 α sind FSH, LPS, Latex beads und Residualkörperchen, sowie Testosteron und IL-1 α selbst (Cudicini et al., 1997; Stephan et al., 1997; Wang et al., 1998). Die Stimulation von Sertoli-Zellen mit FSH, IL-1 α und IL-1 β bewirkt außerdem eine signifikante Erhöhung der Transferrinsekretion, ein Trägerprotein für Eisen (Hulheisel et al., 2002). Inflammatorische Mediatoren wie IL-1 α und IL-1 β , TNF α und LPS führen neben der erhöhten Sekretion von IL-6 zur erhöhten Expression von ICAM-1 und VCAM-1 auf der Oberfläche von Sertoli-Zellen, was zu einer 50%igen Zunahme an Lymphozytenbindung an stimulierten Sertoli-Zellen führt (Riccioli et al., 1995 und 4.4.3).

Wie stark das Immunsystem das männliche Reproduktionssystem beeinflusst, zeigen folgende Wirkungen von IL-1 in Sertoli-Zellen: die Modulation der FSH-induzierte Aromataseaktivität (die Umwandlung von Androgenen in Östrogene) (Kkan and Nieschlag, 1991), Steigerung der IL-6-Produktion (Syed et al., 1993) s.o., Expression von IL-1 Rezeptoren (Gomez et al., 1997) sowie eine Erhöhung der Laktatproduktion (Riera et al., 2001).

LPS und hCG induzieren bei maturen Leydig-Zellen die IL-1 α und IL-1 β -Produktion (Cudicini et al., 1997a,b). IL-1 β wird in Leydig-Zellen wesentlich stärker produziert als IL-1 α . Die Beta-Isoform wirkt auf Sertoli-Zellen, Keimzellen und interstitielle Zellen genauso wie auf nichttestikuläre Zellen. Dies spricht für die parakrine Rolle von IL-1 β und die autokrine Aufgabe von IL-1 α im Hoden (Dinarelo, 1996), die unterstützt wird durch den Befund von Jonsson et al., 2001, dass die Plasmatestosteronkonzentration 2h nach einer durch endotoxin stimulierten Sekretion von IL-1 α um 60% verringert wird. Die Hemmung der Testosteronbiosynthese in Leydigzellen durch IL-1 wird durch die Inhibition des Enzyms P450c17 ausgelöst (Hales 1992). In dieser Arbeit wurde Interleukin-1 β -mRNA in Kontrollhoden durch in-situ-Hybridisierung in Leydig-Zellen des Hodeninterstitiums gezeigt und so dessen physiologische Expression im Hoden nachgewiesen. Dies bestätigt die Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen und verdeutlicht, dass IL-1 β ein wichtiger Bestandteil der gesunden Hoden ist. Wie sich dieses Interleukin im Rahmen der EAO verändert, konnte nicht mehr nachgewiesen werden.

4.4.5 Interleukin-6 als T_H2-Cytokin ?

Ähnlich wie IL-1 ist auch IL-6 ein endogenes Pyrogen. IL-6 wirkt auf viele Körperzellen u.a. stimuliert es die Sekretion der Proteine der akuten Phase in der Leber. Dazu gehören das C-reaktive Protein und das mannosebindende Protein, die eine schnelle aber relativ unspezifische

Antwort auf bakterielle Antigene ermöglichen.

Interleukin-6 ist außerdem eines der potentesten Cytokine zur Aktivierung von B- und T-Lymphocyten (Hirano et al., 1986; Garman et al., 1987). IL-6 steht in engem Zusammenhang zu der Entwicklung von Autoimmunkrankheiten (Hirano 1988; Suematsu 1989). Die Injektionen von rekombinantem humanem IL-6 in Mäuse kann die histologischen Anzeichen (zelluläre Infiltrate) einer EAO signifikant verringern (Li et al., 2002). Dies kann damit erklärt werden, daß IL-6 als T_H2 -Cytokin die Immunantwort des Hodens von einer zellulären Antwort, d. h. T_H1 vermittelten Infiltration von Immunzellen, zu einer humoralen Antwort lenkt. IL-6 wird von den meisten Zellen des Keimepithels, vor allem in denen der Stadien XIII, XIV, I und V gebildet und kann im Stadium VII durch FSH verstärkt induziert werden. Trotzdem haben exogene Gaben von IL-6 inhibitorische Wirkungen auf die meiotische DNA-Synthese der Spermatozyten und Spermatogonien. Dieses Ergebnis zeigt wie empfindlich die parakrine Wirkung von IL-6 auf die Physiologie und den Zyklus des Keimepithels abgestimmt ist (Hakovirta et al., 1995). IL-6-Injektionen können die Testosteronproduktion, durch die Hemmung des cAMP-abhängigen Biosynthesewegs von Testosteron (17β -HSD/type3) (Hales et al., 1999), bei gesunden Männern dosisabhängig signifikant reduzieren. Auch in weiteren Zellen des Hodens wurde die IL-6 Produktion nachgewiesen. Dazu gehören Makrophagen (Bryniarski et al., 2002), Sertoli-Zellen und Leydig-Zellen (Kontogeorgos et al., 2002).

In-situ-Hybridisierungen von Gewebeschnitten mit den IL-6 Sonden zeigten die Veränderungen der IL-6-Expression in der Pathogenese der EAO. In normalen Kontrollhoden konnten einzelne Makrophagen und Leydig-Zellen im Intersitium des Hodens als IL-6(+) dokumentiert werden. Das Ergebniss der Hybridisierung der Hoden aus der Hodenhomogenatgruppe zeigt eine verstärkte IL-6-Expresion der Makrophagen, um die granulomartigen Zellinfiltrationen. So kann IL-6 zum einen direkt an der Stimulation des T_H2 -Weges an der Pathogenese der EAO beteiligt sein (siehe auch 3.4.5). Zum anderen kann IL-6 indirekt, durch Senkung des Testosteronspiegels, die Krankheitsentwicklung beeinflussen. Diese immunsuppressive Wirkung von Androgenen wird bei der Behandlung von Autoimmunkrankheiten, wie der rheumatoiden Arthritis eingesetzt (Cutulo et al., 1999). Testosteron hat eine inhibierende Wirkung auf die IL-1 Sekretion von Monocyten (Li et al., 1993) So kann die immunologisch privilegierte Stellung des Hodens sicherlich zu einem kleinen Teil auch der lokalen Androgenproduktion zugeschrieben werden (Head und Billingham 1995). IL-6 kann nicht nur durch die Aktivierung des T_H2 Weges, sondern auch durch die Schaffung eines androgenarmen Mikroklimas, zusammen mit IL-1, auf die Entwicklung der EAO einwirken.

4.4.6 IL-10 die humorale Protektion des Hodens ?

Das Cytokin IL-10 aktiviert die T_H2 -T-Zellen und stimuliert somit die humorale Immunantwort. In B-Zellen führt es zu einer erhöhten Expression von MHC Klasse II Molekülen, es inhibiert T_H1 Zellen und wirkt inhibierend auf die Cytokinfreisetzung von Makrophagen. Zudem wirkt es costimulierend auf das Mastzellwachstum (Janeway und Travers 1995). In humanen monocytyären dendritischen Zellen führt IL-10 zur Expression von unreifen MHC II Molekülen, die zwar auf der Zelloberfläche exprimiert werden, aber einem erhöhten Membranrecycling unterliegen und so zu einer verminderten T-Zell-Stimulation führen (Morel et al., 2002). Im Hoden wurde IL-10 in Leydig-Zellen und Makrophagen nachgewiesen. Dem Faktor wird eine Rolle beim Aufbau des Immunprivilegs des Hodens zugeschrieben (Verjankorva et al., 2001). Eine Abnahme von IL-10 im Seminalplasma von Männern mit genitalen Infektionen konnten zudem gezeigt werden (Huleihel et al., 1999b).

In diesem Projekt wurde die IL-10 mRNA durch in-situ-Hybridisierung in Leydig-Zellen und Makrophagen der Kontrollhoden nachgewiesen. In den Untersuchungen an EAO Hoden von Tieren die mit Hodenhomogenat immunisiert wurden, zeigten sich vermehrt IL-10 positive Makrophagen, möglicherweise überwiegend die residenten Makrophagen. IL-10 als T_H2 Cytokin kann im Rahmen der EAO-Entwicklung die Antikörperproduktion initiieren oder zumindest forcieren, in dem es die B-Zellaktivierung vorantreibt. Gleichzeitig wirkt es inhibitorisch auf die T-Zellantwort, da es durch unreife MHC II-Komplexe die Stimulation der T_H1 Zellen vermindert, offensichtlich jedoch nicht komplett unterdrücken kann. Die Zunahme der Mastzellzahl in EAO-Hoden kann somit auch auf die erhöhte IL-10-Konzentration zurückzuführen sein.

4.5 Neuro-Immun-Endokrine Interaktionen während der Pathogenese der EAO

Neuro-immun-endokrine Interaktionen geraten zunehmend in den Fokus der medizinischen Forschung. Pro-inflammatorische Cytokine vor allem IL-1, aber auch IL-6 und TNF- α , sind in der Lage, Glukocorticoidausschüttungen und Hyperglykämien zu initiieren (Del Rey et al., 1992), was die neuro-immun-endokrinen Interaktionen verdeutlicht. Den IL-1 induzierten Corticosteroneerhöhungen werden protektive Wirkungen zugeschrieben, die Einfluß auf die Reaktivität der Immunzellen nehmen. Diese Zusammenhänge werden als HPA-Achse (hypothalamus-pituitary-adrenal) bezeichnet, die Entstehen und Verlauf von Autoimmunkrankheiten beeinflußt (Del Rey et al., 2000; Besedovsky et al., 2000).

So können Konzentrationen der beteiligten Parameter im Serum Aufschluß über den Zustand und evtl. über die Beteiligung des HPA-Systems an der Pathogenese der EAO bringen. IL-1 gilt nicht nur als potentester Auslöser für die protektive Glucocorticoidausschüttung, sondern ist, neben den anderen oben erwähnten, auch in der Lage die Testosteronproduktion der Leydig-Zellen zu inhibieren (Hales et al. 1992). Die Untersuchung der **Serumglucosewerte** zeigte keine behandlungsbedingten Veränderungen. Erklärt werden kann dies dadurch, daß diese Art der Veränderung möglicherweise nur in einem bestimmten Zeitintfenster zu beobachten ist. Ein anderer Grund kann die besondere immunprivilegierte Stellung des Hodens sein. Denn auch die intracerebeläre Injektion von IL-1 erzeugt eine erhöhte Corticosteronausschüttung. Sie hat aber eine Hypoglykämie zur Folge, nicht wie sonst üblich eine Hyperglykämie (Del Rey et al., 1992). Ebenfalls unverändert waren die **Serumcorticosteronwerte**. Alle Gruppen weisen hohe interne Schwankungen auf. Als Trend zeigt sich zum einen eine Erhöhung der Serumcorticosteronwerte im Laufe des Alters und zum anderen durch die Behandlungen generell. Dies kann als Antwort auf die entzündlichen Prozesse und möglicherweise die erhöhte IL-1-Konzentration, in den Hoden durch die Pathogenese der EAO, gedeutet werden. Zu beachten ist jedoch, daß auch die Kontrollgruppen hohe Schwankungen aufweisen, die auf stressinduzierte Regelmechanismen bei der Tötung hinweisen können.

Auch die **Testosteronwerte** zeigen große Schwankungen innerhalb der untersuchten Gruppen. Die immunisierten Tiere (Adjuvans und Hodenhomogenat) zeigen leicht erniedrigte Mittelwerte. Dies deutet auf die inhibierende Wirkung entzündlicher Prozesse auf die Steroidogenese der Leydig-Zellen hin.

4.6 Differenziell exprimierte Gene in der EAO

Bei der cDNA-Array-Analyse zeigten sich u.a. die folgenden vier Gene als differenziell exprimiert (CD5, IL-1r1s, IL-7 und IL-8R β). a) Der Zelloberflächenmarker CD5 ist relevant für eine bestimmte Klasse von B- und T-Zellen, deren Wirkung vorwiegend in der nichtadaptiven Immunantwort beschrieben wird. b) IL-1r1s an diesen Rezeptor binden IL-1 α und IL-1 β und der IL-1-Rezeptorantagonist, wodurch eine Hemmung der Interleukin-Wirkung erfolgt. Die Interleukin-1 Rezeptoren Typ I und II wurden im Hoden auf Leydig-Zellen, Sertoli-Zellen, Peritubulär Zellen, pachytänen Spermatocyten und frühen Spermatiden nachgewiesen (Gomez et al., 1997). c) IL-7, ist ein pleiotrophisches Cytokin mit Relevanz für die B-Zell- und T-Zell-Entwicklung (Dus et al., 2003) Und d) IL-8R β einer der beiden Rezeptortypen des α -Chemokins IL-8. IL-8 beeinflusst das Migrationsverhalten von neutrophilen Granulozyten, die diesen Rezeptor exprimieren.

CD5 wird auf einer besonderen Population von B-Zellen exprimiert, die während der frühen Ontogenese in den meisten Organen vorherrschend ist. Diese Subpopulation der B-Zellen produziert große Mengen an polyspezifischen IgM Antikörpern und reagiert auf thymusunabhängige Antigene der Klasse II (TI₂). Das bedeutet, dass sie keine Unterstützung durch T-Zellen benötigen. Das T-Zell-Äquivalent ist ein TCR vom γ/δ -Typ. CD5-Zellen patrouillieren hauptsächlich an Oberflächen, wie z.B. dem Peritonealepithel, und zeigen eine geringe Variabilität ihrer Rezeptoren, d.h. alle CD5-Zellen eines Organs, können hauptsächlich ein Epitop erkennen. Veränderte Körperzellen können unspezifisch, aber sofort erkannt und eliminiert werden. Beteiligungen der γ/δ -T-Zellen an Autoimmunorchitiden (Mukasa et al. 1999) und der CD5 B-Zellen an Diabetes melitus (Kadziela et al., 2003) konnten gezeigt werden. γ/δ -T-Zellen sind in der Lage, sowohl T_H1- als auch T_H2-Cytokine zu bilden (Ferrick et al. 1995), so kann die γ/δ -T-Zell-Antwort die der α/β -T-Zellen beeinflussen. Parallelen zu den Schafversuchen von Okada et al. (2003) und der Versuchsreihe I konnten in den Antikörperprofilen und T-Zell-Reaktivitäten gezeigt werden. Die IgM-Antikörperantwort der CD5-B-Zellen führt nicht zu Gedächtniszellen und flacht nach dem Verschwinden des Antigens ab. Das Profil der Autoantikörper der Wistar Ratten im Versuch III kann auf eine Initiierung der EAO durch die γ/δ -T-Zellen hinweisen, die die entsprechenden T_H1- und T_H2-, bzw. CD5-Zellantworten hervorrufen.

Die RT-PCR-Verifikation der CD5-Expression in der Versuchsreihe I dieser Arbeit konnten die cDNA-Array-Untersuchungen bestätigen. In den Hoden der immunisierten und traumatisierten Tiere war die CD5-Expression erhöht, was für eine Beteiligung der CD5-B-Zellen an der Pa-

thogenese der EAO spricht.

Die Verteilung des **IL1-Rezeptors Typ1** im Hoden wird durch eine negative Feedback-Schleife zwischen der IL-1 und IL-1R1 Expression reguliert (Norman et al. konnte 1996). Im cDNA-Array konnte der IL-1R1 nur in dem Hoden der mit Adjuvans behandelten Tiere nachgewiesen werden. Durch die semiquantitative RT-PCR-Analyse konnte eine signifikante Herabregulation des IL1-R1 in den linken kontralateralen, nicht primär traumatisierten, Hoden aufgezeigt werden. Keines der Tiere entwickelte eine sympathische EAO im kontralateralen Hoden. Durch das Absinken der IL1-R1 Expression werden möglicherweise die pro-inflammatorischen Signale des Cytokins IL-1 nicht vermittelt und folglich eine sympathische EAO im kontralateralen Hoden nicht induziert bzw. verhindert.

IL-7 sorgt bei der Reifung der B-Zellen im Knochenmark für die Fortdauer der Proliferation und das Überleben der Prä-B-Zellen in diesem Stadium. IL-7 schützt die B-Zell-Reifung vor den apoptosefördernden stressbedingten Einfluß von Corticosteron (Laakko et al. 2002), ist beteiligt an der T-Zell Homeostase (Damas et al., 2003), verantwortlich für die Rekombination des γ/δ -T-Zell-Rezeptors (Laky et al., 2003) und für die Proliferation und das Überleben von CD8-T-Zellen sowie deren Entwicklung zu Gedächtniszellen (Schluns et al. konnten 2003).

In dieser Arbeit konnte IL-7 im cDNA-Array nur in dem mit Hodenhomogenat induzierten EAO-Hoden detektiert werden. Mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR als Kontrolle wurde IL-7 in allen behandelten Tieren herabreguliert gefunden. Als signifikant reduziert wurde es in den kontralateralen primär nicht traumatisierten Hoden (TL) der Gruppe der traumatisierten Tiere nach 80 Tagen nachgewiesen.

Zusammen mit der signifikanten Herabregulation von IL-1R1 in den TL-Hoden kann dieses Ergebniss auf eine lokale unterdrückte Immunantwort hinweisen und eine Erklärung für die fehlende Entwicklung einer sympathische EAO sein.

Der IL-8-Rezeptor-beta (**IL8-R- β**), auch CXCR2 genannt, wird von neutrophilen Granulozyten exprimiert und mediiert die Wirkung des chemotaktischen Faktors IL-8 auf Monozyten. Der CXCR2 wird von allen Chemokinen, die das Glu-Leu-Arg (ELR) Motiv N-terminal präsentieren, als Signalempfänger verwendet (Wolf et al., 1998). Diese Rezeptoren wurden auf Mastzellen (Lippert et al., 1998; Nilsson et al., 1999; Inamura et al., 2002), Monozyten (Bonecchi et al., 2000) und auf DCs (Zhu et al., 2000) gefunden. Die Expression dieses Rezeptors wird durch Phagozytose herabreguliert (Kobajashi et al., 2003, Silvestri et al., 2003, Fischer et.al, 2000). Der CXCR2 ist zunächst für die Rekrutierung der Effektorzellen unerlässlich (Goncalves et al., 2002). Eine proteolytische Degradation des Rezeptors führt zu einer Reduktion der chemotak-

tischen Sensitivität dieser Zellen (Doroshenko et al., 2002). Diese TNF- α induzierte Herabregulation des CXCR2 führt zu einer erhöhten Produktion von reaktiven Sauerstoffmetaboliten (Asagoe et al., 1998). Auch in unserem Model konnte eine leichte Herabregulation des IL-8R β , neben einer Hochregulation von TNF- α (siehe auch 4.4.3), in den behandelten Gruppen gezeigt werden. Da die Untersuchung der Hoden nach der Haupteinwanderung der PMNs stattfand, ist die Herabregulation dieses Rezeptors in den behandelten Hoden plausibel und zeigt die bereits eingesetzte Differenzierung der an der EAO beteiligten PMNs.

4.7 Die Rolle der Autoantikörper in der EAO

Antikörper gegen Spermien (ASA) werden oft gefunden in Seminalplasmen infertiler Männer (Imade et al., 1997). Diese Antikörper können auf unterschiedliche Weise die Funktion der Spermien beeinträchtigen. ASA können Einfluß nehmen auf die zellulären Erkennungsmechanismen während des Transportes im weiblichen Genitaltrakt, die Bindung der Spermien an die Eizelle, die Penetration der Zona pellucida, die Fusion mit dem Oolemm (Clayton et al., 2001) und auf die Spermien-Motilität (Mathur et al., 1984) und die Aktivität bei der Penetration des Zervikalschleimes (Imade et al., 1997). Schließlich unterliegen Spermien, die mit Antikörpern beladen in den weiblichen Genitaltrakt gelangen, einem erhöhten Phagozytose-Risiko durch die ortsansässigen Makrophagen (London et al., 1985). Entstehungsort der Autoantikörper ist der Nebenhoden (Pollanen et al., 1994), dessen Gefäßendothelien als Barriere für die Immunglobuline fungieren. Eine signifikante Erhöhung von Autoantikörpern gegen testikuläre Antigene im Serum konnte nach einer Vasektomie in Ratten festgestellt werden und durch kontrazeptive Dosen von Testosteron unterdrückt werden (Pollanen et al., 1995). Dies unterstützt die in 4.4 beschriebenen Wirkungen der Testosteronkonzentrationen bei der Pathogenese der EAO. Die gefundenen testikulären Antigene gegen die diese Ak gerichtet sind haben in verschiedenen Versuchsansätzen (Verajankorva et al., 1999, Saari et al., 1996) und unserem Projekt (siehe Abbildung 39) ein ähnliches Größenspektrum. Die große Menge der Autoantige zeigt, daß nicht nur ein Antigen für die Entstehung einer Infertilität oder EAO verantwortlich zu sein scheint (siehe auch 4.8). Um die mögliche Korrelation der Serumautoantikörper und der Entwicklung einer EAO zu untersuchen, wurden alle Seren der im Versuch vorhandenen Tiere auf Autoantikörper gegen testikuläre Proteine untersucht und mit den Ergebnissen der EAO-Evaluation verglichen. Ein direkter Zusammenhang zwischen EAO und Autoantikörpern konnte in diesem und anderen (Kalaydjiev et al. 2002 und 2001) Versuchen nicht ermittelt werden. Tiere ohne EAO und unbehandelte Tiere wiesen Serumautoantikörper gegen testikuläre Proteine auf. Und EAO(+) Tiere hatten Seren ohne Auto-Ak. Sogar leichte T-Zellinfiltrationen in den Hoden müs-

sen nicht zwangsläufig zur EAO führen (Furbeth et al., 1989).

Unsere Untersuchungen zeigten unterschiedliche Ak-Profile von Wistar/Kyoto-Ratten im Vergleich zu Lewis Ratten. Die Serumautoantikörpertiter fielen bei den Wistarratten über die Versuchszeit ab, während die der Lewis Ratten anstiegen. Diese genotypisch bedingte Reaktionsdifferenz konnte auch von Fesel et al. (1998) gezeigt werden. So scheint es eine genetische Prädisposition für die Ausbildung von Autoimmunantikörpern zu geben, die möglicherweise von der Induzierbarkeit des T_H2 -Weges und der daran beteiligten Zellen abhängig ist und durch die Gabe von bakteriellen Adjuvansien verstärkt wird (siehe auch Abbildung 40 und 4.2). Der verwendete Nachweisantikörper erkennt sowohl IgG- als auch IgM-Antikörper. Verstärkte Induzierbarkeit durch Adjuvansien und das Absinken des Serumspiegels der Autoantikörper während der Inkubationszeit (siehe auch Abbildung 40), sowie die Vielzahl der erkannten Antigene sprechen dafür, daß die nachgewiesenen Autoantikörper, zumindest teilweise, IgM-Antikörper sind, die von CD5-B-Zellen gebildet wurden. Diese Zellgruppe ist in der EAO quantitativ erhöht. Zusammenfassend kann man sagen, dass nur unter geeigneten Bedingungen, wie dem Vorkommen von APCs (siehe 4.3.3), der entsprechenden genetischen Prädisposition (siehe 4.2) und endogenen Adjuvansien (hsps) (siehe 4.8) das Überschreiten der Toleranz und das Auslösen einer EAO erfolgt; auch in den ohne bakterieller Toxine immunisierten Tieren.

4.8 Autoantigene der EAO

Die unter 4.7 beschriebenen Ergebnisse lassen darauf schließen, dass auch in der EAO nicht ausschließlich ein Autoantigen für die Entstehung der Entzündung verantwortlich ist. Autoimmune Reaktionen konnten in den Basalmembranen der Tubuli Seminiferi, im interstitiellen Gewebe den Gefäßendothelien und in degenerierten Keimzellen (Itoh et al., 1991; Yule et al., 1988) gefunden werden. Unterschiede sind nicht nur speziesspezifisch, sondern auch von der Art der EAO-Induktion abhängig. So lassen sich bei aktiv induzierter EAO die initialen und später auch die stärkste Reaktion in den Tubuli seminiferi nachweisen. Wohingegen bei passiv induzierten EAOs die Immunreaktionen hauptsächlich in den Tubuli recti, dem Rete testis und den Ductuli efferentes lokalisiert sind (Teuscher et al., 1994). Dabei ist klar, dass nicht allein die immunisierten Ag über das entstehende AK-Repertoire entscheiden (Itho 1991, Bush et al., 2002, Flickinger et al. 2001, Denduchis et al., 1985, Teuscher et al., 1983 und 1994 Tung et al., 1997), sondern auch zunächst nicht autoantigene Epitope durch entsprechende Adjuvansien Autoimmunreaktionen initiieren (Tung et al., 1984). Entscheidend dabei scheint nicht die Charakteristik des spezifischen Antigens, sondern die Herbeiführung einer Disbalance des Immunsystems der Hoden zu sein, die durch bakterielle Adjuvansien besonders gut gelingt.

Deutlich wird dies durch die unter 4.2 aufgezeigten Ergebnisse und die Arbeiten von Teuscher et. al., 1989, der mit bakteriellem Adjuvansien genetisch nicht prädisponierte Rattenstämme zu einer EAO- Entwicklung gebracht hat. Um mögliche Autoantigene zu finden, die in ihrer Kombination auch ohne die bakteriellen Adjuvansien zu einer EAO führen können, wurde Serum eines EAO positiven Tieres, welches nicht mit bakteriellen Adjuvansien immunisiert wurde, für diese Untersuchungen verwendet (siehe auch 2.2.5). Teilsequenzen von drei autoreaktiven Proteinen wurden bestimmt (siehe auch 3.4.6). Bis zum Zeitpunkt der Abgabe dieser Arbeit konnte keine Homologie zu bekannten Proteinen in den Datenbanken (siehe 2.1.2.2) gefunden werden.

Bei einigen Autoimmunkrankheiten (Myastenia gravis und EAE) erfolgt die Reaktion des Immunsystems gegen ein einzelnes Antigen, wohin gegen andere Autoimmunkrankheiten (Lupus erythematodes) durch Reaktionen gegen verschiedene Autoantigene charakterisiert sind. Besonders immunogen wirkende molekulare Strukturen könnten dabei in Verbindung mit den genetisch prädisponierenden MHC-Molekülen für eine autoantigene Wirkung sorgen. Möglicherweise sind dies auch Molekülkonformationen, die durch die Prozessierung von Mastzellen und die damit bedingte Komplexierung an hsp70 entstehen (Martin et al., 2003) (siehe auch 4.3). Selbst das Alter der Tiere spielt bei der Reaktivität des Immunsystems eine Rolle (Itoh et al., 1994).

5 Zusammenfassung

In Deutschland leidet eines unter 10 Paaren unter ungewollter Kinderlosigkeit, wobei in 50% der Fälle die Ursache beim Mann zu finden ist. Neben idiopathischen und endokrinologischen Störungen nehmen immunologische Ursachen einen Hauptanteil daran ein. Die experimentelle Autoimmun Orchitis (EAO) der Ratte, dient als Model zur Untersuchung immunologisch bedingter Infertilität. In diesem Projekt wurde die EAO durch zwei unterschiedliche Induktionsmodelle ausgelöst. Zum einen wurde durch Injektion von syngenen Hodenhomogenat mit Adjuvans eine Orchitis ausgelöst. Alternativ wurde die Orchitis durch eine Stichtraumatisierung des Hoden der Versuchstiere induziert. Nach 25, 35, 50 und 80 Tagen wurden die Gonaden entnommen und der Schädigungsgrad morphologisch bestimmt, wobei eine starke interstitielle Zellinfiltration in den entzündeten Hoden beobachtet wurde. Immunhistochemisch wurden diese Zellen in den Infiltraten als „inflammatorische“ ED1(+) Makrophagen, residente ED2(+) Makrophagen und verschiedene T-Zell-Subpopulationen (CD8(+), CD4(+)) charakterisiert. Auch die Mastzellen wurden erhöht in beiden Induktionsmodellen gefunden. Ausschließlich in der nicht-traumatisch induzierten EAO zeigte sich eine Verschiebung der im normalen Hoden üblichen CD8(+)- zu einer CD4(+)-T-Zell-Dominanz. Des weiteren akkumulierten nur in der mit Hodenhomogenat ausgelösten EAO die Dendritischen Zellen und IL-2R(+) T-Lymphozyten. Weitere, jedoch vorläufige Ergebnisse, deuten auf eine Erhöhung der MHC II-Expression in den entzündeten Hoden bei beiden Modellen hin. Unter Verwendung des Proliferationsmarkers Ki-67 konnte eine mitotische Vermehrung der Immunzellen ausgeschlossen werden, womit klar ist, daß die Zunahme der Zellzahlen von Leukozyten bei der EAO auf eine Migration zurückzuführen ist. Interessanterweise konnte in diesem Projekt erstmals gezeigt werden, daß sich die CD4-, CD8- und TCR- positiven Zellen über die Versuchszeit, also mit zunehmendem Alter, unabhängig von einer EAO-Entwicklung anreichern. Die Aktivierung des Immunsystems in den entzündeten Hoden wird vornehmlich durch Cytokine vermittelt. Eine veränderte Expression von Schlüssel-Cytokinen konnte mittels in-situ-Hybridisierung dargestellt werden. Dies beinhaltete eine erhöhte Expression von MCP-1 in Makrophagen, Monozyten und Leydig-Zellen in den EAO-Hoden der immunisierten Gruppe. Die hochregulierte Expression kann eine Erklärung für den Anstieg der Makrophagenzahlen im entzündeten Hoden liefern. Das antiinflammatorische Cytokin TGF- β konnte in Kontrollhoden in Leydig-Zellen, Makrophagen, T-Lymphozyten, Spermatogonien und Sertoli-Zellen nachgewiesen werden. Eine erhöhte Expression von TGF- β in entzündeten Hoden kann die für die EAO typische Antikörperreifung, Hem-

mung der Testosteronsynthese und Permeabilitätserhöhung der Blut-Hoden-Schranke erklären. Zudem wurde das T_H1 -Cytokin $TNF-\alpha$ in den entzündeten Hoden verstärkt exprimiert. Dabei wurde $TNF-\alpha$ nicht nur von Makrophagen wie im Kontrollhoden, sondern in den Gonaden von EAO-Tieren zusätzlich von Spermatogonien synthetisiert. IL-6 konnte in den Makrophagen und Leydig-Zellen der Kontrollhoden nachgewiesen werden. Eine stärkere Expression wurde in den gleichen Zellen der EAO-Hoden dokumentiert und kann die Immunbalance in Richtung einer T_H2 -Antwort beeinflussen. Die erhöhte Expression von IL-10 in Makrophagen und Leydig-Zellen in EAO-Hoden unterstützt ebenso direkt eine T_H2 -Antwort. Neben den in-situ-Hybridisierungen wurden differenziell exprimierte Gene mit einer cDNA Atlas Array Analyse untersucht. In immunisierten Tieren wurde CD5 erhöht und IL-8R β herabreguliert gefunden. In den traumatisierten Tieren waren IL1R1 und IL-7 niedriger exprimiert.

Mittels Western-blot Analyse konnte ein anfänglich erhöhter IgM Titer, der bei Wistar Ratten im anschließenden Versuchsverlauf abflachte, nachgewiesen werden. Das Antikörperprofil der Lewis Ratten dagegen spricht für einen gleichbleibend erhöhten Autoantikörpertiter vom IgG-Typ.

Die unterschiedlichen Reaktions- und Cytokinmuster der beiden Induktionsmodelle und das Ausbleiben einer sympathischen EAO im kontralateralen, nicht traumatisierten Hoden, weisen darauf hin, daß es sich bei der Stichtraumatisierung nicht um eine Autoimmunreaktion, sondern um eine abheilende und vernarbende Entzündung zu handeln scheint. Bei den mit syngenen Hodenhomogenat immunisierten Tieren konnte ein Cytokinprofil für EAO-Tiere dokumentiert werden. Zusätzlich konnte die humorale Beteiligung an der EAO Entwicklung durch den Nachweis von Autoantigenen mittels 2-D-Gel-Elektrophorese und Western-blot gezeigt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Asagoe K, Yamamoto K, Takahashi A, Suzuki K, Maeda A, Nohgawa M, Harakawa N, Takano K, Mukaida N, Matsushima K, Okuma M, Sasada M. 1998.** Down-regulation of CXCR2 expression on human polymorphonuclear leukocytes by TNF-alpha. *J.Immunol.* **160**: 4518-4525.
- Avallet O, Gomez E, Vigier M, Jegou B, Saez JM. 1997.** Sertoli cell-germ cell interactions and TGF beta 1 expression and secretion in vitro. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* **238**: 905-909.
- Bagavant H, Thompson C, Ohno K, Setiady Y, Tung KS. 2002.** Differential effect of neonatal thymectomy on systemic and organ-specific autoimmune disease. *Int.Immunol.* **14**: 1397-1406.
- Belles C, Kuhl A, Nosheny R, Carding SR. 1999.** Plasma membrane expression of heat shock protein 60 in vivo in response to infection. *Infect.Immun.* **67**: 4191-4200.
- Besedovsky HO, Del Rey A. 2000.** The cytokine-HPA axis feed-back circuit. *Z.Rheumatol.* **59 Suppl 2**: II/26-II/30.
- Bhattacharyya SP, Drucker I, Reshef T, Kirshenbaum AS, Metcalfe DD, Mekori YA. 1998.** Activated T lymphocytes induce degranulation and cytokine production by human mast cells following cell-to-cell contact. *J.Leukoc.Biol.* **63**: 337-341.
- Bonecchi R, Facchetti F, Dusi S, Luini W, Lissandrini D, Simmelink M, Locati M, Bernasconi S, Allavena P, Brandt E, Rossi F, Mantovani A, Sozzani S. 2000.** Induction of functional IL-8 receptors by IL-4 and IL-13 in human monocytes. *J.Immunol.* **164**: 3862-3869.
- Bonorino C, Nardi NB, Zhang X, Wysocki LJ. 1998.** Characteristics of the strong antibody response to mycobacterial Hsp70: a primary, T cell-dependent IgG response with no evidence of natural priming or gamma delta T cell involvement. *J.Immunol.* **161**: 5210-5216.
- Bryniarski K, Szewczyk K, Ptak M, Bobek M, Ptak W. 2002.** A two step procedure to fractionate mouse testicular macrophages with different cytokine profiles. *Arch.Immunol.Ther.Exp.(Warsz.)* **50**: 225-229.
- Bush LA, Herr JC, Wolkowicz M, Sherman NE, Shore A, Flickinger CJ. 2002.** A novel asparaginase-like protein is a sperm autoantigen in rats. *Mol.Reprod.Dev.* **62**: 233-247.
- Cerami A. 1992.** Inflammatory cytokines. *Clin.Immunol.Immunopathol.* **62**: S3-10.
- Cheadle EJ, Selby PJ, Jackson AM. 2003.** Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin-infected dendritic cells potently activate autologous T cells via a B7 and interleukin-12-dependent mechanism. *Immunology* **108**: 79-88.
- Chow SH, Giglio W, Anesetti R, Ottenweller JE, Pogach LM, Huang HF. 2000.** The

effects of testicular denervation on spermatogenesis in the Sprague-Dawley rat. *Neuroendocrinology* **72**: 37-45.

Cohen PE, Pollard JW. 1998. Normal sexual function in male mice lacking a functional type I interleukin-1 (IL-1) receptor. *Endocrinology* **139**: 815-818.

Clayton R, Moore H. 2001. Experimental models to investigate the pathology of antisperm antibodies: approaches and problems. *Hum.Reprod.Update.* **7**: 457-459.

Cudicini C, Kercret H, Touzalin AM, Ballet F, Jegou B. 1997a. Vectorial production of interleukin 1 and interleukin 6 by rat Sertoli cells cultured in a dual culture compartment system. *Endocrinology* **138**: 2863-2870.

Cudicini C, Lejeune H, Gomez E, Bosmans E, Ballet F, Saez J, Jegou B. 1997b. Human Leydig cells and Sertoli cells are producers of interleukins-1 and -6. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **82**: 1426-1433.

Cutolo M, Sulli A, Villaggio B, Seriola B, Accardo S. 1998. Relations between steroid hormones and cytokines in rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann.Rheum.Dis.* **57**: 573-577.

Damas JK, Waehre T, Yndestad A, Otterdal K, Hognestad A, Solum NO, Gullestad L, Froland SS, Aukrust P. 2003. Interleukin-7-mediated inflammation in unstable angina: possible role of chemokines and platelets. *Circulation* **107**: 2670-2676.

David JR. 1966. Delayed hypersensitivity in vitro: its mediation by cell-free substances formed by lymphoid cell-antigen interaction. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **56**: 72-77.

de Jong EC, Vieira PL, Kalinski P, Schuitemaker JH, Tanaka Y, Wierenga EA, Yazdanbakhsh M, Kapsenberg ML. 2002. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J.Immunol.* **168**: 1704-1709.

Del Rey A, Besedovsky HO. 1992. Metabolic and neuroendocrine effects of pro-inflammatory cytokines. *Eur.J.Clin.Invest* **22 Suppl 1**: 10-15.

Del Rey A, Besedovsky HO. 2000. The cytokine-HPA axis circuit contributes to prevent or moderate autoimmune processes. *Z.Rheumatol.* **59 Suppl 2**: II/31-II/35.

Denduchis B, Satz ML, Sztejn MB, Puig RP, Doncel G, Lustig L. 1985. Multifocal damage of the testis induced in rats by passive transfer of antibodies prepared against non-collagenous fraction of basement membrane. *J.Reprod.Immunol.* **7**: 59-75.

Dinarelli CA. 1996. Biologic basis for interleukin-1 in disease. *Blood* **87**: 2095-2147.

Doncel GF, Lustig L. 1991. Lymphocyte subsets in the lymph nodes of rats with autoimmune orchitis. *Am.J.Reprod.Immunol.* **25**: 35-40.

- Doroshenko T, Chaly Y, Savitskiy V, Maslakova O, Portyanko A, Gorudko I, Voitenok NN. 2002.** Phagocytosing neutrophils down-regulate the expression of chemokine receptors CXCR1 and CXCR2. *Blood* **100**: 2668-2671.
- Dunzendorfer S, Wiedermann CJ. 2001.** Neuropeptides and the immune system: focus on dendritic cells. *Crit Rev.Immunol.* **21**: 523-557.
- Dus D, Krawczenko A, Zalecki P, Paprocka M, Wiedlocha A, Goupille C, Kieda C. 2003.** IL-7 receptor is present on human microvascular endothelial cells. *Immunol.Lett.* **86**: 163-168.
- Feger F, Varadaradjalou S, Gao Z, Abraham SN, Arock M. 2002.** The role of mast cells in host defense and their subversion by bacterial pathogens. *Trends Immunol.* **23**: 151-158.
- Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H. 1995.** Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature* **373**: 255-257.
- Fesel C, Coutinho A. 1998.** Dynamics of serum IgM autoreactive repertoires following immunization: strain specificity, inheritance and association with autoimmune disease susceptibility. *Eur.J.Immunol.* **28**: 3616-3629.
- Fischer FR, Santambrogio L, Luo Y, Berman MA, Hancock WW, Dorf ME. 2000.** Modulation of experimental autoimmune encephalomyelitis: effect of altered peptide ligand on chemokine and chemokine receptor expression. *J.Neuroimmunol.* **110**: 195-208.
- Flickinger CJ, Rao J, Bush LA, Sherman NE, Oko RJ, Jayes FC, Herr JC. 2001.** Outer dense fiber proteins are dominant postobstruction autoantigens in adult Lewis rats. *Biol.Reprod.* **64**: 1451-1459.
- Fourney RM, Miyakoshi J** DRIPM. Northern blotting: Efficient RNA staining and transfer. 10, 5-7. 1988. Focus.
Ref Type: Generic
- Frungieri MB, Calandra RS, Lustig L, Meineke V, Kohn FM, Vogt HJ, Mayerhofer A. 2002.** Number, distribution pattern, and identification of macrophages in the testes of infertile men. *Fertil.Steril.* **78**: 298-306.
- Frungieri MB, Urbanski HF, Hohne-Zell B, Mayerhofer A. 2000.** Neuronal elements in the testis of the rhesus monkey: ontogeny, characterization and relationship to testicular cells. *Neuroendocrinology* **71**: 43-50.
- Furbeth C, Hubner G, Thoenes GH. 1989.** Spontaneous immune complex orchitis in brown Norway rats. *Virchows Arch.B Cell Pathol.Incl.Mol.Pathol.* **57**: 37-45.
- Gao JF, Call SB, Fillmore PD, Watanabe T, Meeker ND, Teuscher C. 2003.** Analysis of the role of Bphs/Hrh1 in the genetic control of responsiveness to pertussis toxin. *Infect.Immun.* **71**: 1281-1287.

- Garman RD, Jacobs KA, Clark SC, Raulet DH. 1987.** B-cell-stimulatory factor 2 (beta 2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **84**: 7629-7633.
- Gautier C, Levacher C, Avallet O, Vigier M, Rouiller-Fabre V, Lecerf L, Saez J, Habert R. 1994.** Immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 1 in the fetal and neonatal rat testis. *Mol.Cell Endocrinol.* **99**: 55-61.
- Gautier C, Levacher C, Saez JM, Habert R. 1997.** Expression and regulation of transforming growth factor beta1 mRNA and protein in rat fetal testis in vitro. *Biochem.Bio-phys.Res.Comm.* **236**: 135-139.
- Gaytan F, Bellido C, Aceitero J, Aguilar E, Sanchez-Criado JE. 1990.** Leydig cell involvement in the paracrine regulation of mast cells in the testicular interstitium of the rat. *Biol.Reprod.* **43**: 665-671.
- Gaytan F, Bellido C, Morales C, van Rooijen N, Aguilar E. 1995.** Role of testicular macrophages in the response of Leydig cells to gonadotrophins in young hypophysectomized rats. *J.Endocrinol.* **147**: 463-471.
- Gaytan F, Carrera G, Pinilla L, Aguilar R, Bellido C. 1989.** Mast cells in the testis, epididymis and accessory glands of the rat: effects of neonatal steroid treatment. *J.Androl* **10**: 351-358.
- Gerard N, Syed V, Bardin W, Genetet N, Jegou B. 1991.** Sertoli cells are the site of interleukin-1 alpha synthesis in rat testis. *Mol.Cell Endocrinol.* **82**: R13-R16.
- Gerdprasert O, O'Bryan MK, Nikolic-Paterson DJ, Sebire K, de Kretser DM, Hedger MP. 2002.** Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and macrophage colony-stimulating factor in normal and inflamed rat testis. *Mol.Hum.Reprod.* **8**: 518-524.
- Gomez E, Morel G, Cavalier A, Lienard MO, Haour F, Courtens JL, Jegou B. 1997.** Type I and type II interleukin-1 receptor expression in rat, mouse, and human testes. *Biol.Reprod.* **56**: 1513-1526.
- Goncalves AS, Appelberg R. 2002.** The involvement of the chemokine receptor CXCR2 in neutrophil recruitment in LPS-induced inflammation and in Mycobacterium avium infection. *Scand.J.Immunol.* **55**: 585-591.
- Groux H. 2003.** Type 1 T-regulatory cells: their role in the control of immune responses. *Transplantation* **75**: 8S-12S.
- Haidl G, Schill WB. 1991.** [Male fertility disorders. 1: Diagnostic procedures]. *Fortschr.Med.* **109**: 701-704.
- Hakovirta H, Syed V, Jegou B, Parvinen M. 1995.** Function of interleukin-6 as an inhibitor of meiotic DNA synthesis in the rat seminiferous epithelium. *Mol.Cell Endocrinol.* **108**: 193-198.

Hales DB. 1992. Interleukin-1 inhibits Leydig cell steroidogenesis primarily by decreasing 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase cytochrome P450 expression. *Endocrinology* **131**: 2165-2172.

Hales DB. 1996 In: The Leydig cell. Payne, A. H., Hardy, M. P., and Russel, L. D (eds.). Cache River Press: Vienna, IL., 451-466..

Ref Type: Generic

Hales DB. 2002. Testicular macrophage modulation of Leydig cell steroidogenesis. *J.Reprod.Immunol.* **57**: 3-18.

Hales DB, Diemer T, Hales KH. 1999. Role of cytokines in testicular function. *Endocrine.* **10**: 201-217.

Hardy MP, Sottas CM, Ge R, McKittrick CR, Tamashiro KL, McEwen BS, Haider SG, Markham CM, Blanchard RJ, Blanchard DC, Sakai RR. 2002. Trends of reproductive hormones in male rats during psychosocial stress: role of glucocorticoid metabolism in behavioral dominance. *Biol.Reprod.* **67**: 1750-1755.

Hardy MP, Zirkin BR, Ewing LL. 1989. Kinetic studies on the development of the adult population of Leydig cells in testes of the pubertal rat. *Endocrinology* **124**: 762-770.

Harlow E, LANE D. Antibodies: A Laboratory Manual. 1988. Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY.

Ref Type: Generic

Hayes R, Chalmers SA, Nikolic-Paterson DJ, Atkins RC, Hedger MP. 1996. Secretion of bioactive interleukin 1 by rat testicular macrophages in vitro. *J.Androl* **17**: 41-49.

Head JR, Billingham RE. 1985. Immune privilege in the testis. II. Evaluation of potential local factors. *Transplantation* **40**: 269-275.

Hedger MP. 1997. Testicular leukocytes: what are they doing? *Rev.Reprod.* **2**: 38-47.

Hedger MP. 2002. Macrophages and the immune responsiveness of the testis. *J.Reprod.Immunol.* **57**: 19-34.

Hedger MP, Eddy EM. 1987. The heterogeneity of isolated adult rat Leydig cells separated on Percoll density gradients: an immunological, cytochemical, and functional analysis. *Endocrinology* **121**: 1824-1838.

Hedger MP, Meinhardt A. 2000. Local regulation of T cell numbers and lymphocyte-inhibiting activity in the interstitial tissue of the adult rat testis. *J.Reprod.Immunol.* **48**: 69-80.

Hedger MP, Wang J, Lan HY, Atkins RC, Wreford NG. 1998. Immunoregulatory activity in adult rat testicular interstitial fluid: relationship with intratesticular CD8+ lymphocytes following treatment with ethane dimethane sulfonate and testosterone implants. *Biol.Reprod.* **58**: 935-942.

Hempelmann E. Stable polychromatic silver staining. **Kaminsky, R.** 7, 481. 1986. Electrophoresis.

Ref Type: Generic

Hickman SP, Chan J, Salgame P. 2002. Mycobacterium tuberculosis induces differential cytokine production from dendritic cells and macrophages with divergent effects on naive T cell polarization. *J.Immunol.* **168**: 4636-4642.

Hirano T, Matsuda T, Turner M, Miyasaka N, Buchan G, Tang B, Sato K, Shimizu M, Maini R, Feldmann M, . 1988. Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur.J.Immunol.* **18**: 1797-1801.

Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, . 1986. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* **324**: 73-76.

Hofmann N, von Zezschwitz HC. Hodenatrophie und Schädigung des kontralateralen Hodengewebes nach Leistenbruchoperationen. B[17], 43-48. 1977. Urologe.

Ref Type: Generic

Hofmann N, Kuwert E. 1979. [Chronic, nonpathogen-related orchitis]. *Z.Hautkr.* **54**: 173-180.

Hou W, Wu Y, Sun S, Shi M, Sun Y, Yang C, Pei G, Gu Y, Zhong C, Sun B. 2003. Pertussis toxin enhances Th1 responses by stimulation of dendritic cells. *J.Immunol.* **170**: 1728-1736.

Huleihel M, Levy A, Lunenfeld E, Horowitz S, Potashnik G, Glezerman M. 1997. Distinct expression of cytokines and mitogenic inhibitory factors in semen of fertile and infertile men. *Am.J.Reprod.Immunol.* **37**: 304-309.

Huleihel M, Lunenfeld E. 2002. Involvement of intratesticular IL-1 system in the regulation of Sertoli cell functions. *Mol.Cell Endocrinol.* **187**: 125-132.

Huleihel M, Lunenfeld E, Horowitz S, Levy A, Potashnik G, Mazor M, Glezerman M. 1999. Expression of IL-12, IL-10, PGE2, sIL-2R and sIL-6R in seminal plasma of fertile and infertile men. *Andrologia* **31**: 283-288.

Huleihel M, Zeyse D, Lunenfeld E, Zeyse M, Mazor M. 2002. Induction of transferrin secretion in murine Sertoli cells by FSH and IL-1: the possibility of different mechanism(s) of regulation. *Am.J.Reprod.Immunol.* **47**: 112-117.

Hutson JC. 1994. Testicular macrophages. *Int.Rev.Cytol.* **149**: 99-143.

Ichinohe T, Ichimiya S, Kishi A, Tamura Y, Kondo N, Ueda G, Torigoe T, Yamaguchi A, Hiratsuka H, Hirai I, Kohama GI, Sato N. 2003. T-cell receptor variable gamma chain gene expression in the interaction between rat gammadelta-type T cells and heat-shock protein 70-like molecule. *Microbiol.Immunol.* **47**: 351-357.

Imade GE, Baker HW, de Kretser DM, Hedger MP. 1997. Immunosuppressive activities in the seminal plasma of infertile men: relationship to sperm antibodies and autoimmunity. *Hum.Reprod.* **12**: 256-262.

Inamura H, Kurosawa M, Okano A, Kayaba H, Majima M. 2002. Expression of the interleukin-8 receptors CXCR1 and CXCR2 on cord-blood-derived cultured human mast cells. *Int.Arch.Allergy Immunol.* **128**: 142-150.

Itoh M, Hiramane C, Tokunaga Y, Mukasa A, Hojo K. 1991. A new murine model of autoimmune orchitis induced by immunization with viable syngeneic testicular germ cells alone. II. Immunohistochemical findings of fully-developed inflammatory lesion. *Autoimmunity* **10**: 89-97.

Itoh M, Miki T, Takeuchi Y, Miyake M, De Rooij DG. 1994. Immunohistological localization of autoantigens detected by serum autoantibodies from mice with experimental autoimmune orchitis without using adjuvants. *Arch.Androl* **32**: 45-52.

Izawa JI, Armstrong CE, Hammerberg O, Vallely J. 1999. Tuberculous epididymo-orchitis: a case report. *Can.J.Urol.* **6**: 751-756.

Janeway C.A.jr. und Travers P. Immunologie. 1995. Heidelberg; Berlin; Oxford: Spektrum Akademischer Verlag. RefType: Generic

Jegou B, Cudicini C, Gomez E, Stephan JP. 1995. Interleukin-1, interleukin-6 and the germ cell-Sertoli cell cross-talk. *Reprod.Fertil.Dev.* **7**: 723-730.

Jonsson CK, Setchell BP, Martinelle N, Svechnikov K, Soder O. 2001. Endotoxin-induced interleukin 1 expression in testicular macrophages is accompanied by downregulation of the constitutive expression in Sertoli cells. *Cytokine* **14**: 283-288.

Kadziela K, Kowalska H, Rymkiewicz-Kluczynska B, Kowalska M, Miskurka G, Rybczynska J, Wasik M, Pankowska E. 2003. Changes in lymphocyte subsets in children with newly diagnosed type 1 diabetes mellitus. *J.Pediatr.Endocrinol.Metab* **16**: 185-191.

Kalaydjiev S, Dimitrova D, Nenova M, Peneva S, Dikov I, Nakov L. 2002. Serum sperm antibodies are not elevated after mumps orchitis. *Fertil.Steril.* **77**: 76-82.

Kalaydjiev S, Dimitrova D, Tsvetkova P, Tsvetkov D. 2001. Serum sperm antibodies unrelated to mumps orchitis. *Andrologia* **33**: 69-70.

Kalish RS, Askenase PW. 1999. Molecular mechanisms of CD8+ T cell-mediated delayed hypersensitivity: implications for allergies, asthma, and autoimmunity. *J.Allergy Clin.Immunol.* **103**: 192-199.

Kaminsky R, Kruger N, Hempelmann E, Bommer W. 1986. Reduced development of *Plasmodium falciparum* in beta-thalassaemic erythrocytes. *Z.Parasitenkd.* **72**: 553-556.

Kern S, Robertson SA, Mau VJ, Maddocks S. 1995. Cytokine secretion by macrophages in

the rat testis. *Biol.Reprod.* **53**: 1407-1416.

Khan SA, Nieschlag E. 1991. Interleukin-1 inhibits follitropin-induced aromatase activity in immature rat Sertoli cells in vitro. *Mol.Cell Endocrinol.* **75**: 1-7.

Kirshenbaum AS, Goff JP, Kessler SW, Mican JM, Zsebo KM, Metcalfe DD. 1992. Effect of IL-3 and stem cell factor on the appearance of human basophils and mast cells from CD34+ pluripotent progenitor cells. *J.Immunol.* **148**: 772-777.

Kobayashi SD, Voyich JM, Braughton KR, DeLeo FR. 2003. Down-regulation of proinflammatory capacity during apoptosis in human polymorphonuclear leukocytes. *J.Immunol.* **170**: 3357-3368.

Kontogeorgos G, Messini I, Kyrodinou E, Giannikaki L, Zois E, Koukoulis G, Tsagarakis S. 2002. Immunohistochemical localization of interleukin-6 in peripheral human endocrine glands. *Endocrine.* **17**: 135-140.

Kostic TS, Andric SA, Maric D, Kovacevic RZ. 2000. Inhibitory effects of stress-activated nitric oxide on antioxidant enzymes and testicular steroidogenesis. *J.Steroid Biochem.Mol.Biol.* **75**: 299-306.

Krishnaswamy G, Kelley J, Johnson D, Youngberg G, Stone W, Huang SK, Bieber J, Chi DS. 2001. The human mast cell: functions in physiology and disease. *Front Biosci.* **6**: D1109-D1127.

Kuwana M. 2002. Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets. *Hum.Immunol.* **63**: 1156-1163.

Laakko T, Schwartz RC, Fraker PJ. 2002. IL-7-mediated protection of pro and pre-B cells from the adverse effects of corticosterone. *Cell Immunol.* **220**: 39-50.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.

Laky K, Lewis JM, Tigelaar RE, Puddington L. 2003. Distinct requirements for IL-7 in development of TCR gamma delta cells during fetal and adult life. *J.Immunol.* **170**: 4087-4094.

Lambrecht BN. 2001. Immunologists getting nervous: neuropeptides, dendritic cells and T cell activation. *Respir.Res.* **2**: 133-138.

Le Goffic R, Mouchel T, Aubry F, Patard JJ, Ruffault A, Jegou B, Samson M. 2002. Production of the chemokines monocyte chemoattractant protein-1, regulated on activation normal T cell expressed and secreted protein, growth-related oncogene, and interferon-gamma-inducible protein-10 is induced by the Sendai virus in human and rat testicular cells. *Endocrinology* **143**: 1434-1440.

Le Goffic R, Mouchel T, Ruffault A, Patard JJ, Jegou B, Samson M. 2003. Mumps virus

decreases testosterone production and gamma interferon-induced protein 10 secretion by human leydig cells. *J.Virol.* **77**: 3297-3300.

Lee CC, Caskey CT. cDNA cloning using degenerate primers. 46-53. 1990. Academic Press; San Diego, pp. (Innis MA, Gelfand DH Sninsky JJ White TJ eds.

Ref Type: Generic

Legge KL, Gregg RK, Maldonado-Lopez R, Li L, Caprio JC, Moser M, Zaghoulani H. 2002. On the role of dendritic cells in peripheral T cell tolerance and modulation of autoimmunity. *J.Exp.Med.* **196**: 217-227.

Levy S, Serre V, Hermo L, Robaire B. 1999. The effects of aging on the seminiferous epithelium and the blood-testis barrier of the Brown Norway rat. *J.Androl* **20**: 356-365.

Li L, Itoh M, Ablake M, Macri B, Bendtzen K, Nicoletti F. 2002. Prevention of murine experimental autoimmune orchitis by recombinant human interleukin-6. *Clin.Immunol.* **102**: 135-137.

Li X, Hales KH, Watanabe G, Lee RJ, Pestell RG, Hales DB. 1997. The effect of tumor necrosis factor-alpha and cAMP on induction of AP-1 activity in MA-10 tumor Leydig cells. *Endocrine.* **6**: 317-324.

Li ZG, Danis VA, Brooks PM. 1993. Effect of gonadal steroids on the production of IL-1 and IL-6 by blood mononuclear cells in vitro. *Clin.Exp.Rheumatol.* **11**: 157-162.

Lippert U, Artuc M, Grutzkau A, Moller A, Kenderessy-Szabo A, Schadendorf D, Norgauer J, Hartmann K, Schweitzer-Stenner R, Zuberbier T, Henz BM, Kruger-Krasagakes S. 1998. Expression and functional activity of the IL-8 receptor type CXCR1 and CXCR2 on human mast cells. *J.Immunol.* **161**: 2600-2608.

Lipscomb HL, Gardner PJ, Sharp JG. 1979. The effect of neonatal thymectomy on the induction of autoimmune orchitis in rats. *J.Reprod.Immunol.* **1**: 209-217.

London SN, Haney AF, Weinberg JB. 1985. Macrophages and infertility: enhancement of human macrophage-mediated sperm killing by antisperm antibodies. *Fertil.Steril.* **43**: 274-278.

Lui WY, Wong CH, Mruk DD, Cheng CY. 2003. TGF-beta3 regulates the blood-testis barrier dynamics via the p38 mitogen activated protein (MAP) kinase pathway: an in vivo study. *Endocrinology* **144**: 1139-1142.

Lukyanenko Y, Chen JJ, Hutson JC. 2002. Testosterone regulates 25-hydroxycholesterol production in testicular macrophages. *Biol.Reprod.* **67**: 1435-1438.

Luo L, Chen H, Zirkin BR. 2001. Leydig cell aging: steroidogenic acute regulatory protein (StAR) and cholesterol side-chain cleavage enzyme. *J.Androl* **22**: 149-156.

Lustig L, Lourtou L, Perez R, Doncel GF. 1993. Phenotypic characterization of lymphocytic

- cell infiltrates into the testes of rats undergoing autoimmune orchitis. *Int.J.Androl* **16**: 279-284.
- Ma RZ, Gao J, Meeker ND, Fillmore PD, Tung KS, Watanabe T, Zachary JF, Offner H, Blankenhorn EP, Teuscher C. 2002.** Identification of Bphs, an autoimmune disease locus, as histamine receptor H1. *Science* **297**: 620-623.
- Mangan J, Butcher P.** Running AMOC with SUPERScript II Reverse Transcriptase. 15[3], 67. 1993. Focus.
Ref Type: Generic
- Marriott I, Bost KL. 2001.** Substance P receptor mediated macrophage responses. *Adv.Exp.Med.Biol.* **493**: 247-254.
- Martin CA, Carsons SE, Kowalewski R, Bernstein D, Valentino M, Santiago-Schwarz F. 2003.** Aberrant extracellular and dendritic cell (DC) surface expression of heat shock protein (hsp)70 in the rheumatoid joint: possible mechanisms of hsp/DC-mediated cross-priming. *J.Immunol.* **171**: 5736-5742.
- Mathur S, Williamson HO, Baker ME, Rust PF, Holtz GL, Fudenberg HH. 1984.** Sperm motility on postcoital testing correlates with male autoimmunity to sperm. *Fertil.Steril.* **41**: 81-87.
- Mauduit C, Gasnier F, Rey C, Chauvin MA, Stocco DM, Louisot P, Benahmed M. 1998.** Tumor necrosis factor- α inhibits leydig cell steroidogenesis through a decrease in steroidogenic acute regulatory protein expression. *Endocrinology* **139**: 2863-2868.
- Mauduit C, Hartmann DJ, Chauvin MA, Revol A, Morera AM, Benahmed M. 1991.** Tumor necrosis factor α inhibits gonadotropin action in cultured porcine Leydig cells: site(s) of action. *Endocrinology* **129**: 2933-2940.
- Mayerhofer A, Frungieri MB, Fritz S, Bulling A, Jessberger B, Vogt HJ. 1999.** Evidence for catecholaminergic, neuronlike cells in the adult human testis: changes associated with testicular pathologies. *J.Androl* **20**: 341-347.
- Mealy K, Robinson B, Millette CF, Majzoub J, Wilmore DW. 1990.** The testicular effects of tumor necrosis factor. *Ann.Surg.* **211**: 470-475.
- Meeker ND, Hickey WF, Korngold R, Hansen WK, Sudweeks JD, Wardell BB, Griffith JS, Teuscher C. 1995.** Multiple loci govern the bone marrow-derived immunoregulatory mechanism controlling dominant resistance to autoimmune orchitis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**: 5684-5688.
- Meikle AW, Cardoso de Sousa JC, Ward JH, Woodward M, Samlowski WE. 1991.** Reduction of testosterone synthesis after high dose interleukin-2 therapy of metastatic cancer. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **73**: 931-935.
- Meineke V, Frungieri MB, Jessberger B, Vogt H, Mayerhofer A. 2000.** Human testicular mast cells contain tryptase: increased mast cell number and altered distribution in the testes of

infertile men. *Fertil.Steril.* **74**: 239-244.

Meinhardt A, Bacher M, McFarlane JR, Metz CN, Seitz J, Hedger MP, de Kretser DM, Bucala R. 1996. Macrophage migration inhibitory factor production by Leydig cells: evidence for a role in the regulation of testicular function. *Endocrinology* **137**: 5090-5095.

Meinhardt A, Bacher M, Metz C, Bucala R, Wreford N, Lan H, Atkins R, Hedger M. 1998. Local regulation of macrophage subsets in the adult rat testis: examination of the roles of the seminiferous tubules, testosterone, and macrophage-migration inhibitory factor. *Biol.Reprod.* **59**: 371-378.

Mekori YA, Metcalfe DD. 1999. Mast cell-T cell interactions. *J.Allergy Clin.Immunol.* **104**: 517-523.

Mendis-Handagama SM, Risbridger GP, de Kretser DM. 1987. Morphometric analysis of the components of the neonatal and the adult rat testis interstitium. *Int.J.Androl* **10**: 525-534.

Metcalfe DD, Baram D, Mekori YA. 1997. Mast cells. *Physiol Rev.* **77**: 1033-1079.

Miller SC, Bowman BM, Rowland HG. 1983. Structure, cytochemistry, endocytic activity, and immunoglobulin (Fc) receptors of rat testicular interstitial-tissue macrophages. *Am.J.Anat.* **168**: 1-13.

Mizushima H, Nakamura Y, Matsumoto H, Dohi K, Matsumoto K, Shioda S, Banks WA. 2001. The effect of cardiac arrest on the blood-testis barrier to albumin, tumor necrosis factor- α , pituitary adenylate cyclase activating polypeptide, sucrose, and verapamil in the mouse. *J.Androl* **22**: 255-260.

Modlin RL, Pirmez C, Hofman FM, Torigian V, Uyemura K, Rea TH, Bloom BR, Brenner MB. 1989. Lymphocytes bearing antigen-specific gamma delta T-cell receptors accumulate in human infectious disease lesions. *Nature* **339**: 544-548.

Morel AS, Coulton G, Londei M. 2002. Regulation of major histocompatibility complex class II synthesis by interleukin-10. *Immunology* **106**: 229-236.

Moser M. 2003. Dendritic cells in immunity and tolerance-do they display opposite functions? *Immunity.* **19**: 5-8.

Mukasa A, Born WK, O'Brien RL. 1999. Inflammation alone evokes the response of a TCR-invariant mouse gamma delta T cell subset. *J.Immunol.* **162**: 4910-4913.

Mukasa A, Hiromatsu K, Matsuzaki G, O'Brien R, Born W, Nomoto K. 1995. Bacterial infection of the testis leading to autoaggressive immunity triggers apparently opposed responses of alpha beta and gamma delta T cells. *J.Immunol.* **155**: 2047-2056.

Mukasa A, Lahn M, Pflum EK, Born W, O'Brien RL. 1997. Evidence that the same gamma delta T cells respond during infection-induced and autoimmune inflammation. *J.Immunol.* **159**: 5787-5794.

Mukasa A, Yoshida H, Kobayashi N, Matsuzaki G, Nomoto K. 1998. Gamma delta T cells in infection-induced and autoimmune-induced testicular inflammation. *Immunology* **95**: 395-401.

Mullis KB, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Ehrlich H. Spezifische enzymatische amplifikation von DNA in vitro: The polymerase chain reaction. I. 51, 263. 1986. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Bio.
Ref Type: Generic

Mullis KB, Faloona FA. 1987. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* **155**: 335-350.

Nilsson G, Mikovits JA, Metcalfe DD, Taub DD. 1999. Mast cell migratory response to interleukin-8 is mediated through interaction with chemokine receptor CXCR2/Interleukin-8RB. *Blood* **93**: 2791-2797.

O'Brien RL, Happ MP, Dallas A, Palmer E, Kubo R, Born WK. 1989. Stimulation of a major subset of lymphocytes expressing T cell receptor gamma delta by an antigen derived from Mycobacterium tuberculosis. *Cell* **57**: 667-674.

O'Bryan MK, Schlatt S, Phillips DJ, de Kretser DM, Hedger MP. 2000. Bacterial lipopolysaccharide-induced inflammation compromises testicular function at multiple levels in vivo. *Endocrinology* **141**: 238-246.

Okada K, Sonoda K, Koyama M, Yin S, Ikeda M, Goryo M, Chen SL, Kabeya H, Ohishi K, Onuma M. 2003. Delayed-type hypersensitivity in sheep induced by synthetic peptides of bovine leukemia virus encapsulated in mannan-coated liposome. *J.Vet.Med.Sci.* **65**: 515-518.

Olaso R, Gautier C, Levacher C, Durand P, Saez J, Habert R. 1997. The immunohistochemical localization of transforming growth factor-beta 2 in the fetal and neonatal rat testis. *Mol.Cell Endocrinol.* **126**: 165-172.

Oldenhove G, de Heusch M, Urbain-Vansanten G, Urbain J, Maliszewski C, Leo O, Moser M. 2003. CD4+ CD25+ regulatory T cells control T helper cell type 1 responses to foreign antigens induced by mature dendritic cells in vivo. *J.Exp.Med.* **198**: 259-266.

Ozawa N, Goda N, Makino N, Yamaguchi T, Yoshimura Y, Suematsu M. 2002. Leydig cell-derived heme oxygenase-1 regulates apoptosis of premeiotic germ cells in response to stress. *J.Clin.Invest* **109**: 457-467.

Passarge E. Taschenatlas der Genetik. 1994. Stuttgart; New York : Thieme.
Ref Type: Generic

Pentikainen V, Erkkila K, Suomalainen L, Ojala M, Pentikainen MO, Parvinen M, Dunkel L. 2001. TNFalpha down-regulates the Fas ligand and inhibits germ cell apoptosis in the human testis. *J.Clin.Endocrinol.Metab* **86**: 4480-4488.

Pfeffer K, Schoel B, Gulle H, Kaufmann SH, Wagner H. 1990. Primary responses of human

T cells to mycobacteria: a frequent set of gamma/delta T cells are stimulated by protease-resistant ligands. *Eur.J.Immunol.* **20**: 1175-1179.

Pollanen P, Cooper TG. 1994. Immunology of the testicular excurrent ducts. *J.Reprod.Immunol.* **26**: 167-216.

Pollanen P, Jahnukainen K, Punnonen J, Sainio-Pollanen S. 1992. Ontogeny of immunosuppressive activity, MHC antigens and leukocytes in the rat testis. *J.Reprod.Immunol.* **21**: 257-274.

Pollanen P, Niemi M. 1987. Immunohistochemical identification of macrophages, lymphoid cells and HLA antigens in the human testis. *Int.J.Androl* **10**: 37-42.

Pollanen P, Saari T, Yeung CH, Cooper TG. 1995. Regulation of the transport of immunoglobulin G into the male rat reproductive tract. *J.Reprod.Immunol.* **28**: 111-135.

Pollanen P, von Euler M, Jahnukainen K, Saari T, Parvinen M, Sainio-Pollanen S, Soder O. 1993. Role of transforming growth factor beta in testicular immunosuppression. *J.Reprod.Immunol.* **24**: 123-137.

Pollanen PP, Kallajoki M, Risteli L, Risteli J, Suominen JJ. 1985. Laminin and type IV collagen in the human testis. *Int.J.Androl* **8**: 337-347.

Raburn DJ, Coquelin A, Reinhart AJ, Hutson JC. 1993. Regulation of the macrophage population in postnatal rat testis. *J.Reprod.Immunol.* **24**: 139-151.

Riccioli A, Filippini A, De Cesaris P, Barbacci E, Stefanini M, Starace G, Ziparo E. 1995. Inflammatory mediators increase surface expression of integrin ligands, adhesion to lymphocytes, and secretion of interleukin 6 in mouse Sertoli cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **92**: 5808-5812.

Richardson LL, Kleinman HK, Dym M. 1998. Altered basement membrane synthesis in the testis after tissue injury. *J.Androl* **19**: 145-155.

Riera MF, Meroni SB, Gomez GE, Schteingart HF, Pellizzari EH, Cigorrage SB. 2001. Regulation of lactate production by FSH, iL1beta, and TNFalpha in rat Sertoli cells. *Gen.Comp Endocrinol.* **122**: 88-97.

Roberts RJ. 1983. Restriction and modification enzymes and their recognition sequences. *Nucleic Acids Res.* **11**: r135-r167.

Roper RJ, Doerge RW, Call SB, Tung KS, Hickey WF, Teuscher C. 1998. Autoimmune orchitis, epididymitis, and vasitis are immunogenetically distinct lesions. *Am.J.Pathol.* **152**: 1337-1345.

Roper RJ, Ma RZ, Biggins JE, Butterfield RJ, Michael SD, Tung KS, Doerge RW, Teuscher C. 2002. Interacting quantitative trait loci control loss of peripheral tolerance and susceptibility to autoimmune ovarian dysgenesis after day 3 thymectomy in mice. *J.Immunol.*

169: 1640-1646.

Roper RJ, McAllister RD, Biggins JE, Michael SD, Min SH, Tung KS, Call SB, Gao J, Teuscher C. 2003. Aod1 controlling day 3 thymectomy-induced autoimmune ovarian dysgenesis in mice encompasses two linked quantitative trait loci with opposing allelic effects on disease susceptibility. *J.Immunol.* **170**: 5886-5891.

Rossi P, Dolci S, Albanesi C, Grimaldi P, Ricca R, Geremia R. 1993. Follicle-stimulating hormone induction of steel factor (SLF) mRNA in mouse Sertoli cells and stimulation of DNA synthesis in spermatogonia by soluble SLF. *Dev.Biol.* **155**: 68-74.

Saari T, Jahnukainen K, Pollanen P. 1996. Autoantigenicity of the basal compartment of seminiferous tubules in the rat. *J.Reprod.Immunol.* **31**: 65-79.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.

Sainio-Pollanen S, Henriksen K, Parvinen M, Simell O, Pollanen P. 1997. Stage-specific degeneration of germ cells in the seminiferous tubules of non-obese diabetic mice. *Int.J.Androl* **20**: 243-253.

Sakamoto Y, Matsumoto T, Mizunoe Y, Haraoka M, Sakumoto M, Kumazawa J. 1995. Testicular injury induces cell-mediated autoimmune response to testis. *J.Urol.* **153**: 1316-1320.

Sambrook J, Fritsch EF a MT. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, (2nd ed.).* 1989.
Ref Type: Generic

Sandlow JI, Feng HL, Cohen MB, Sandra A. 1996. Expression of c-KIT and its ligand, stem cell factor, in normal and subfertile human testicular tissue. *J.Androl* **17**: 403-408.

Schirren C, von Thiesenhausen HJ. 1972. [Studies of testicular biopsies in andrological patients with orchitis, epididymitis and traumatic testicular damages in the anamnesis (author's transl)]. *Andrologie.* **4**: 327-342.

Schluns KS, Lefrancois L. 2003. Cytokine control of memory T-cell development and survival. *Nat.Rev.Immunol.* **3**: 269-279.

Selvage DJ, Rivier C. 2003. Importance of the paraventricular nucleus of the hypothalamus as a component of a neural pathway between the brain and the testes that modulates testosterone secretion independently of the pituitary. *Endocrinology* **144**: 594-598.

Shibaki A, Katz SI. 2002. Induction of skewed Th1/Th2 T-cell differentiation via subcutaneous immunization with Freund's adjuvant. *Exp.Dermatol.* **11**: 126-134.

Shull MM, Ormsby I, Kier AB, Pawlowski S, Diebold RJ, Yin M, Allen R, Sidman C, Proetzel G, Calvin D, . 1992. Targeted disruption of the mouse transforming growth factor-

beta 1 gene results in multifocal inflammatory disease. *Nature* **359**: 693-699.

Silvestri T, Meliconi R, Pulsatelli L, Dolzani P, Zizzi F, Frizziero L, Borzi RM, Facchini A. 2003. Down-modulation of chemokine receptor cartilage expression in inflammatory arthritis. *Rheumatology.(Oxford)* **42**: 14-18.

Skokos D, Botros HG, Demeure C, Morin J, Peronet R, Birkenmeier G, Boudaly S, Mecheri S. 2003. Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo. *J.Immunol.* **170**: 3037-3045.

Snoek M, Teuscher C, van Vugt H. 1998. Molecular analysis of the major MHC recombinational hot spot located within the G7c gene of the murine class III region that is involved in disease susceptibility. *J.Immunol.* **160**: 266-272.

Sonoda KH, Matsuzaki G, Nomura A, Yamada H, Hamano S, Nakamura T, Mukasa A, Nomoto K. 1997. Macrophages activated by *Listeria monocytogenes* induce organ-specific autoimmunity. *Immunology* **92**: 274-283.

Soramoto S, Hiramane C, Takenaka I, Hojo K. 1993. Murine experimental autoimmune orchitis (EAO) induced by syngeneic testicular germ cells (TC) alone: orchitogenic and lymphostimulatory activities of TC from mice at various ages. *Clin.Immunol.Immunopathol.* **69**: 292-299.

Spooner CE, Markowitz NP, Saravolatz LD. 1992. The role of tumor necrosis factor in sepsis. *Clin.Immunol.Immunopathol.* **62**: S11-S17.

Srivastava PK. 2000. Heat shock protein-based novel immunotherapies. *Drug News Perspect.* **13**: 517-522.

Stephan JP, Syed V, Jegou B. 1997. Regulation of Sertoli cell IL-1 and IL-6 production in vitro. *Mol.Cell Endocrinol.* **134**: 109-118.

Stevens A, Lowe J. Histologie. 1992. Cambridge; New York, NY : VCH.
Ref Type: Generic

Straw AD, MacDonald AS, Denkers EY, Pearce EJ. 2003. CD154 plays a central role in regulating dendritic cell activation during infections that induce Th1 or Th2 responses. *J.Immunol.* **170**: 727-734.

Strohmeyer T, Reese D, Press M, Ackermann R, Hartmann M, Slamon D. 1995. Expression of the c-kit proto-oncogene and its ligand stem cell factor (SCF) in normal and malignant human testicular tissue. *J.Urol.* **153**: 511-515.

Suematsu S, Matsuda T, Aozasa K, Akira S, Nakano N, Ohno S, Miyazaki J, Yamamura K, Hirano T, Kishimoto T. 1989. IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **86**: 7547-7551.

Suescun MO, Rival C, Theas MS, Calandra RS, Lustig L. 2003. Involvement of tumor

necrosis factor-alpha in the pathogenesis of autoimmune orchitis in rats. *Biol.Reprod.* **68**: 2114-2121.

Syed V, Gerard N, Kaipia A, Bardin CW, Parvinen M, Jegou B. 1993. Identification, ontogeny, and regulation of an interleukin-6-like factor in the rat seminiferous tubule. *Endocrinology* **132**: 293-299.

Teuscher C. 1985. Experimental allergic orchitis in mice. II. Association of disease susceptibility with the locus controlling Bordetella pertussis-induced sensitivity to histamine. *Immunogenetics* **22**: 417-425.

Teuscher C, Butterfield RJ, Ma RZ, Zachary JF, Doerge RW, Blankenhorn EP. 1999. Sequence polymorphisms in the chemokines Scya1 (TCA-3), Scya2 (monocyte chemoattractant protein (MCP)-1), and Scya12 (MCP-5) are candidates for eae7, a locus controlling susceptibility to monophasic remitting/nonrelapsing experimental allergic encephalomyelitis. *J.Immunol.* **163**: 2262-2266.

Teuscher C, Hickey WF, Grafer CM, Tung KS. 1998. A common immunoregulatory locus controls susceptibility to actively induced experimental allergic encephalomyelitis and experimental allergic orchitis in BALB/c mice. *J.Immunol.* **160**: 2751-2756.

Teuscher C, Hickey WF, Korngold R. 1990a. An analysis of the role of tumor necrosis factor in the phenotypic expression of actively induced experimental allergic orchitis and experimental allergic encephalomyelitis. *Clin.Immunol.Immunopathol.* **54**: 442-453.

Teuscher C, Hickey WF, Korngold R. 1990b. Experimental allergic orchitis in mice. V. Resistance to actively induced disease in BALB/cJ substrain mice is mediated by CD4+ T cells. *Immunogenetics* **32**: 34-40.

Teuscher C, Meeker ND, Livingstone KD, Sudweeks JD, Griffith JS, Wardell BB, Hickey WF. 1994. Experimental allergic orchitis in mice. VII. Preliminary characterization of the aspermatogenic autoantigens responsible for eliciting actively and passively induced disease. *J.Reprod.Immunol.* **26**: 233-249.

Teuscher C, Smith SM, Goldberg EH, Shearer GM, Tung KS. 1985. Experimental allergic orchitis in mice. I. Genetic control of susceptibility and resistance to induction of autoimmune orchitis. *Immunogenetics* **22**: 323-333.

Teuscher C, Smith SM, Tung KS. 1987. Experimental allergic orchitis in mice: III. Differential susceptibility and resistance among BALB/c sublines. *J.Reprod.Immunol.* **10**: 219-230.

Teuscher C, Wild GC, Tung KS. 1983. Experimental allergic orchitis: the isolation and partial characterization of an aspermatogenic polypeptide (AP3) with an apparent sequential disease-inducing determinant(s). *J.Immunol.* **130**: 2683-2688.

Teuscher C, Zhou ZZ, Zheng Y, Hickey WF. 1989. Actively induced experimental allergic orchitis in Lewis-resistant (Le-R) rats: reversibility of disease resistance by immunization with Bordetella pertussis. *Cell Immunol.* **119**: 233-238.

- Tokunaga Y, Hiramane C, Hojo K. 1993a.** Genetic susceptibility to the induction of murine experimental autoimmune orchitis (EAO) without adjuvant. II. Analysis on susceptibility to EAO induction using F1 hybrid mice and adoptive transfer system. *Clin.Immunol.Immunopathol.* **66:** 248-253.
- Tokunaga Y, Hiramane C, Itoh M, Mukasa A, Hojo K. 1993b.** Genetic susceptibility to the induction of murine experimental autoimmune orchitis (EAO) without adjuvant. I. Comparison of pathology, delayed type hypersensitivity, and antibody. *Clin.Immunol.Immunopathol.* **66:** 239-247.
- Tompkins AB, Hutchinson P, de Kretser DM, Hedger MP. 1998.** Characterization of lymphocytes in the adult rat testis by flow cytometry: effects of activin and transforming growth factor beta on lymphocyte subsets in vitro. *Biol.Reprod.* **58:** 943-951.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979.** Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **76:** 4350-4354.
- Tsai M, Shih LS, Newlands GF, Takeishi T, Langley KE, Zsebo KM, Miller HR, Geissler EN, Galli SJ. 1991a.** The rat c-kit ligand, stem cell factor, induces the development of connective tissue-type and mucosal mast cells in vivo. Analysis by anatomical distribution, histochemistry, and protease phenotype. *J.Exp.Med.* **174:** 125-131.
- Tsai M, Takeishi T, Thompson H, Langley KE, Zsebo KM, Metcalfe DD, Geissler EN, Galli SJ. 1991b.** Induction of mast cell proliferation, maturation, and heparin synthesis by the rat c-kit ligand, stem cell factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **88:** 6382-6386.
- Tsigos C, Papanicolaou DA, Kyrou I, Raptis SA, Chrousos GP. 1999.** Dose-dependent effects of recombinant human interleukin-6 on the pituitary-testicular axis. *J.Interferon Cytokine Res.* **19:** 1271-1276.
- Tung KS, Primakoff P, Woolman-Gamer L, Myles DG. 1997.** Mechanism of infertility in male guinea pigs immunized with sperm PH-20. *Biol.Reprod.* **56:** 1133-1141.
- Tung KS, Smith S, Teuscher C, Cook C, Anderson RE. 1987.** Murine autoimmune oophoritis, epididymoorchitis, and gastritis induced by day 3 thymectomy. Immunopathology. *Am.J.Pathol.* **126:** 293-302.
- Tung PS, Fritz IB. 1984.** Autoimmune orchitis can be induced by thymic lymphocytes auto-sensitized against syngeneic sertoli cells in vitro. *Biol.Reprod.* **30:** 979-990.
- Vasu C, Dogan RN, Holterman MJ, Prabhakar BS. 2003.** Selective induction of dendritic cells using granulocyte macrophage-colony stimulating factor, but not fms-like tyrosine kinase receptor 3-ligand, activates thyroglobulin-specific CD4+/CD25+ T cells and suppresses experimental autoimmune thyroiditis. *J.Immunol.* **170:** 5511-5522.
- Verajankorva E, Martikainen M, Pollanen P. 2001.** Cytokines in the BALB/c mouse testis in various conditions. *Asian J.Androl* **3:** 9-19.

- Verajankorva E, Martikainen M, Saraste A, Sundstrom J, Pollanen P. 1999.** Sperm antibodies in rat models of male hormonal contraception and vasectomy. *Reprod.Fertil.Dev.* **11**: 49-57.
- von Schnakenburg C, Hinrichs B, Fuchs J, Kardorff R. 2000.** Post-transplant epididymitis and orchitis following *Listeria monocytogenes* septicaemia. *Pediatr.Transplant.* **4**: 156-158.
- Wan T, Zhou X, Chen G, An H, Chen T, Zhang W, Liu S, Jiang Y, Yang F, Wu Y, Cao X. 2004.** Novel heat shock protein Hsp70L1 activates dendritic cells and acts as a Th1 polarizing adjuvant. *Blood* **103**: 1747-1754.
- Wang DL, Nagpal ML, Calkins JH, Chang WW, Sigel MM, Lin T. 1991.** Interleukin-1 beta induces interleukin-1 alpha messenger ribonucleic acid expression in primary cultures of Leydig cells. *Endocrinology* **129**: 2862-2866.
- Wang J, Wreford NG, Lan HY, Atkins R, Hedger MP. 1994.** Leukocyte populations of the adult rat testis following removal of the Leydig cells by treatment with ethane dimethane sulfonate and subcutaneous testosterone implants. *Biol.Reprod.* **51**: 551-561.
- Wang JE, Josefsen GM, Hansson V, Haugen TB. 1998.** Residual bodies and IL-1alpha stimulate expression of mRNA for IL-1alpha and IL-1 receptor type I in cultured rat Sertoli cells. *Mol.Cell Endocrinol.* **137**: 139-144.
- Warren DW, Pasupuleti V, Lu Y, Platler BW, Horton R. 1990.** Tumor necrosis factor and interleukin-1 stimulate testosterone secretion in adult male rat Leydig cells in vitro. *J.Androl* **11**: 353-360.
- Wekerle H, Begemann M. 1978.** In vitro induction of experimental autoimmune orchitis: characterization of a primary T lymphocyte response against testicular self antigens. *Eur.J.Immunol.* **8**: 294-302.
- Wolf M, Delgado MB, Jones SA, Dewald B, Clark-Lewis I, Baggiolini M. 1998.** Granulocyte chemotactic protein 2 acts via both IL-8 receptors, CXCR1 and CXCR2. *Eur.J.Immunol.* **28**: 164-170.
- Xiong Y, Hales DB. 1993.** The role of tumor necrosis factor-alpha in the regulation of mouse Leydig cell steroidogenesis. *Endocrinology* **132**: 2438-2444.
- Yamazaki S, Iyoda T, Tarbell K, Olson K, Velinzon K, Inaba K, Steinman RM. 2003.** Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J.Exp.Med.* **198**: 235-247.
- Yao V, Platell C, Hall JC. 2002.** Dendritic cells. *ANZ.J.Surg.* **72**: 501-506.
- Yee JB, Hutson JC. 1983.** Testicular macrophages: isolation, characterization and hormonal responsiveness. *Biol.Reprod.* **29**: 1319-1326.
- Yule TD, Montoya GD, Russell LD, Williams TM, Tung KS. 1988.** Autoantigenic germ

cells exist outside the blood testis barrier. *J.Immunol.* **141**: 1161-1167.

Yule TD, Tung KS. 1993. Experimental autoimmune orchitis induced by testis and sperm antigen-specific T cell clones: an important pathogenic cytokine is tumor necrosis factor. *Endocrinology* **133**: 1098-1107.

Zeine R, Pon R, Ladiwala U, Antel JP, Filion LG, Freedman MS. 1998. Mechanism of gammadelta T cell-induced human oligodendrocyte cytotoxicity: relevance to multiple sclerosis. *J.Neuroimmunol.* **87**: 49-61.

Zhang GX, Kishi M, Xu H, Rostami A. 2002a. Mature bone marrow-derived dendritic cells polarize Th2 response and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mult.Scler.* **8**: 463-468.

Zhang L, Lizzio EF, Gubina E, Chen T, Mostowski H, Kozlowski S. 2002b. Organ-specific cytokine polarization induced by adoptive transfer of transgenic T cells. *J.Immunol.* **169**: 5514-5521.

Zhou ZZ, Zheng Y, Steenstra R, Hickey WF, Teuscher C. 1989. Actively-induced experimental allergic orchitis (EAO) in Lewis/NCR rats: sequential histo- and immunopathologic analysis. *Autoimmunity* **3**: 125-134.

Zhu K, Shen Q, Ulrich M, Zheng M. 2000. Human monocyte-derived dendritic cells expressing both chemotactic cytokines IL-8, MCP-1, RANTES and their receptors, and their selective migration to these chemokines. *Chin Med.J.(Engl.)* **113**: 1124-1128.

7 Anhang

7.0.1 Abkürzungsverzeichnis

AG	Antigen
AK	Antikörper
AP	Alkalische Phosphatase
APC	Antigen präsentierende Zelle
A.dest.	Aqua destillata
bp	Basenpaare (base paires) Bausteine der Nucleinsäuren
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumin)
C.A.S.T.Grid	Computer Assisted Steriological Toolbox, Software der Firma Olympus, wurde zur Quantifizierung der Immunzellpopulationen verwendet
CD	Differenzierungscluster (cluster of differentiation) sind Gruppen monoklonaler AK, die dasselbe Zelloberflächenmolekül erkennen. Werden mit CD und einer Zahl gekennzeichnet.
DNA/cDNA	Desoxyribonucleinsäure (desoxyribonucleic acid), Substanz in der in den meisten Organismen die Erbinformation codiert ist / complementary DNA
dNTP	Abk. für ein beliebiges 2'-Desoxy-Nucleosid-5'-Triphosphat, in PCRs als Gemisch aller vier Nucleoside (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) verwendet
d/w	Trockengewicht (dry weight)
et al.	und andere
FKS	Fötales Kälber Serum
h	Stunde (hour)
kb	kilobase, Längenangabe von DNA-Fragmenten
LB	Luria-Bertani, nach ihr wurde das Medium und der Agar benannt
LPS	Lipopolysaccharide, Membranoberflächenmoleküle gramnegativer Bakterien
M/mM	Mol (Molekulargewicht)
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex (major histocompatibility complex)
MMLV-RT	Moloney Murine leukaemia virus Reverse Transkriptase, spezielle RT, mit geringer RNase H-Aktivität und fehlender DNA-Endonuclease-Aktivität

NGS	Normalserum der Ziege (normal goat serum)
NHS	Normalserum des Pferdes (normal horse serum)
NRS	Normalserum der Ratte (normal rat serum)
N	Normalität, Maßeinheit, entspricht bei einwertigen Ionen der Molarität
Oligo dT	Oligonucleotid-desoxy-Thymidin, kurze als Primer verwendete DNA-Fragmente, die mit den Poly-A-Enden der mRNA-Moleküle hybridisieren und so die benötigten doppelsträngigen Startsequenzen für die Amplifikation der cDNA bilden
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
PMN	Polymorphkernige Neutrophile
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA/m	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)/ messenger
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Reverse Transkriptase, Enzym der Retroviren, im Labor zur cDNA-Synthese verwendet
RT	Raumtemperatur
TH	T-Helferzellen
ü.N.	über Nacht
(v/v)	Volumen pro Volumen
(w/v)	Gewicht pro Volumen (weight per volume)

7.0.2 Lebenslauf

Name: Simone Gränz

Anschrift: Wolfskaute 3, 35447 Reiskirchen/Burkhardsfelden

Geburtsdatum: 10.10.1968

Geburtsort: Gießen

Familienstand: ledig

Schulische Ausbildung:

1975 - 1979 Grundschule Reiskirchen

1979 - 1981 IGS - Busecker - Tal

1981 - 1988 Landgraf - Ludwig - Gymnasium Gießen

 Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Beruflicher Werdegang:

1988 - 1990 Berufsausbildung zur
Medizinisch technischen Laborassistentin
an der JLU Gießen

1991 - 1992 MTLA im Mikrogefäßlabor
der Frauenklinik Gießen

Studium:

1992 - 1997 Studium der Humanbiologie im Fachbereich Medizin
an der Philipps - Universität Marburg

1997 - 1998 Diplomarbeit am Institut für Humangenetik der
Philipps - Universität Marburg bei Herrn Prof. Grzeschik
mit dem Thema:
Untersuchungen zur Deletion im Chromosom 7
beim Williams - Beuren - Syndrom

1999 - 2002 Experimentelle Arbeiten zur Anfertigung einer
Promotionsarbeit am Institut für Anatomie und
Zellbiologie (Prof. Meinhardt/ Prof. Aumüller/Prof. Seitz)
mit dem Thema: Immunologische Pathomechanismen der
experimentellen Autoimmun-Orchitis

2002 - 2004 Wissenschaftliches Arbeiten im GABA Projekt
der Kinderklinik der JLU Gießen zur Klärung
der GABAergen Beteiligung des astrocytären
hypothalamischen Kompartimentes bei der
Pubertätsentwicklung

7.0.3 Liste der Akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen der Herren:

Aumüller, Beato, Elsässer, Fischer, Frenking, Fuhs, Grzeschik, Habermehl, Hartmann, Hassilik, Hensel, Jenc, Jungclas, Kadenbach, Kern, Kirchner, Koolmann, Lang, H.G. Löffler, M. Löffler, von Löw, Lührmann, Müller, Niessing, Röhm, Rogausch, Schachtschabel, Schäfer, Schmidt, Schulz, K.A. Seitz, J. Seitz, Steinmetz, Thomas, Voigt, Weihe, Zickendraht

7.0.4 Danksagung

Mein Dank gilt zunächst den Professoren Meinhard, Aumüller und Seitz für die Überlassung des Themas, die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppen, die Freiheit zur selbständigen wissenschaftlichen Entwicklung und die Möglichkeit und Unterstützung zur Erlangung meines Stipendiums, welches mir den Australienaufenthalt ermöglichte. Und so gilt mein Dank auch Dr. Mark Hedger für die freundliche Aufnahme und Unterstützung in Melbourne (Thank you Mark for your friendly help and an the dinner).

Danken möchte ich auch dem DAAD und der Euresco für die *Grants*, durch die die Reisen nach Melbourne und Spanien erst möglich wurden.

Allen lieben Menschen in der Anatomie möchte ich danken für die sehr freundschaftliche Arbeitsatmosphäre. So gilt mein Dank Anne Henkeler, Claudia Keppler, Elke Völk-Badouin, Andrea Cordes und Suada Fröhlich für die standhafte Freundlichkeit und Hilfsbereitschaft trotz nicht enden wollender Fragen, die nie auszugehen scheinen. Letztere machte ihrem Namen alle Ehre und sorgte durch ihren unkonventionellen Humor immer für eine Heiterkeit, die die Arbeit besonders beflügelte. Herrn Gerhard Jennemann danke ich dafür, daß er auch mir „Universal-dilettanten“ einen kleinen Teil seines histologischen Wissens eröffnete und natürlich für die Hilfe bei den histologischen Arbeiten von A-Z. Auch Frau Damms Häuser, Frau Hofbauer und Herrn Dreher möchte ich Danken für die Überlassung des ein oder anderen Antikörpers.

Frau Prof. Steiniger, Frau Prof. Grau und Birgit Herbst danke ich besonders für die engagierte Unterstützung bei der Optimierung der Immunhistochemie und die Aufnahme in ihr Labor und die Frühstücksrunde.

Danke auch an Gabriella Nicholls, Jens Cordes, Herrn Littauer, und Frau Balser, um nur einige zu nennen, für die vielen kleinen Dinge, wie Formulare, Unterschriften, Mülltüten, Wägelchen, Adventsgestecke und einfach das Hinterherputzen. Besonderen Dank gilt hier auch Claudia Cy-

bon, für die sehr hilfreiche Unterstützung bei den iv-Injektionen.

Und ein Dank auch an die Reginas (Dr. Eickhoff und Dr. Wiche), Bärchen (Mathias), Dr. Beate Wilhelm, Katrin Blumbach, Judith Gutberlet und Miriam Rodewald für die schöne Zeit.

Und danke Mutti (Anja Wahle) für die Zeit als Mitdotorandin (Du weißt schon, gelle!?), die Übernachtungsmöglichkeiten in Marburg und Leipzig und die vielen Dididis, auch wenn Du zweimal zur Niederkunft nach Leipzig geflohen bist.

Thanks Jules and Aeme (Julie and Graeme Kelly) for the „ginormes“ time in Oz, the mobile in the bush, the minties, the „winy“ evenings, the thursdays lift to Chadstone, Ballarat and the kids in a cheerycar. I truely hope that we will keep in touch and continue traveling across the ocean. Also thanks Sally, Richard, Cathrin and all the others for the great fare well party. Thank you Maroline Bakker for the special weekend at Blackwood-Park, it was the first time we saw an opossum and never had such a fresh orangejuice before.

Danke an die Mädels (Tina, Pop und Regina), daß Ihr die Mädels seid.

Danke Josef und Regina für das Luftschloss mit Hängebrücke. Danke Geli für die liebevollen Karten und deren Inhalt. Danke Boris und Bille für die jährlichen Zwetschen.

Auch herzlichen Dank an Sigrid, für die sehr gewissenhafte Fehlersuche.

Danke Katja für die echt fruchtbaren Diskusionen, die Hilfe bei den 2D-Gelen, das Korrekturlesen, die Swabedoos und das Fellchen und dafür das Du da bist.

Danke Mama, Papa, Andreas, Carmen, Niklas und Enola für die Familie die Ihr seid und die Hilfe bei allem was ansteht.

Danke Harry für Alles,- Danke.

7.0.5 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, Simone Gränz, ehrenwörtlich, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Immunologische Pathomechanismen der experimentellen Autoimmun-Orchitis“ im Institut für Anatomie und Zellbiologie der Philipps Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. rer. physiol. Andreas Meinhardt ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt habe und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Im Rahmen dieser Arbeit sind folgende Kongressbeiträge angenommen worden:

International Workshop on New Trends in Molecular Andrology

Rauischholzhausen, 3./4. May 2002

Alteration of Immune Cell Parameters during the Development of Experimental-Auto-Immune-Orchitis (EAO) in Rats

Graenz S., Lewen A., Hedger M. P.[#], Seitz J.^{*}, Aumüller G.^{*}, Meinhardt A.

35.Jahrestag zur Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung

Leipzig, 14./15. Februar 2002

Cytokine Expression, Immune Cell Infiltration and Initial Characterisation of Testicular Auto-Antigens in Experimental Auto Immune Orchitis (EAO) in Rats

S Graenz, A Lewen, J Seitz, G Aumüller, A Meinhardt; Abstract book 2002 ISBN 3-935747-06-3

35.Jahrestag zur Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung

Leipzig, 14./15. Februar 2002

Regulation of Neurotransmitter Receptor Expression During Experimental Autoimmune Orchitis (EAO) in the Rat: Potential Role in Modulating the Immune Response

Lewen A., Graenz S., Seitz J., Aumüller G., Meinhardt A.; Abstract book 2002 ISBN 3-935747-06-3

35.Jahrestag zur Physiologie und Pathologie der Fortpflanzung

Leipzig, 14./15. Februar 2002

Signalling Pathways of the Cytokine Macrophage Migration Inhibitory Factor in Testicular Peritubular Cells

Rodewald M, Eickhoff R, Gränz S, Lewen A, Seitz J, Meinhardt A.; Abstract book 2002 ISBN 3-935747-06-3

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Reproduktionsmedizin

Gießen, 16. November 2001

Serum Auto-Antibodies and Immune Cell Infiltration in Experimental Auto Immune Orchitis (EAO) in Lewis and Wistar Rats

S Graenz, A Lewen, J Seitz, G Aumueller, A Meinhardt

EuroConference on Molekular Aspects of the Initiation and Regulation of Immune Responses,

Communication with the Immune System: Basic Rules and their Breakdown

San Feliu de Guixols, Spain, 13.-18. October 2001

Phenotypic and quantitative characterisation of immune cells and serum antibodies during experimental autoimmune orchitis in the rat (EAO)

Graenz S., Lewen A., Hedger M. P., Seitz J., Aumueller G., Meinhardt A.

Reise und Kongressteilnahme wurden durch ein Stipendium der EURESCO finanziert.

Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Andrologie

Berlin, 6.-8. September 2001

Signal Transduction of the Cytokine Macrophage Migration Inhibitory Factor involves Protein Kinase C in Testicular Peritubular Cells

Wiegand M, Gränz S, Seitz J and Meinhardt A.

Burkhardsfelden, den

Simone Gränz